



UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité Biologie Cellulaire

Arrêté ministériel : 7 Août 2006

Présentée et soutenue publiquement par

Elodie Lages

Le 17 Décembre 2010

Expression et fonction des microARN dans les tumeurs du Système Nerveux Central

Thèse dirigée par **Jean-Paul Issartel**

Thèse préparée au sein du laboratoire « **Nanomédecine et cerveau** »

INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences

Dans l'Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

Composition du jury :

Pr Emmanuel Gay	CHU Grenoble	Président
Pr Catherine Dumas-Duport	CH Sainte Anne Paris	Rapporteur
Dr Emmanuel Garcion	INSERM U646 Angers	Rapporteur
Dr Catherine Nguyen	TAGC Marseille	Examineur
Pr François Berger	INSERM U836 Grenoble	Examineur
Dr Jean-Paul Issartel	INSERM U836 Grenoble	Examineur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. François Berger de m'avoir accueillie au sein de son équipe « Nanomédecine et Cerveau » anciennement unité INSERM U318 devenue Equipe 7 de l'Institut des Neurosciences de Grenoble.

Je remercie également les membres du jury et notamment le Pr. Catherine Daumas-Duport, le Dr. Catherine Nguyen, le Dr. Emmanuel Garcion et le Pr. Emmanuel Gay pour avoir accepté de faire partie de mon jury et d'évaluer mon travail de thèse.

Jean-Paul, merci pour ton encadrement sans faille pendant toutes ces années, pour tes conseils et ta disponibilité qui m'ont permis de mener à bien ce projet de thèse. Merci également pour tes fameux jeux de mots qui m'ont bien fait sourire !!

Merci à Michèle, Virginie, Nadine et Béatrice pour votre accueil lors de mon arrivée loin de mes terres natales et votre aide précieuse pour démarrer du bon pied dans le laboratoire. Audrey et Hélène, merci pour votre contribution efficace à ce projet notamment ces derniers temps.

Je remercie les personnes de l'équipe « Nanomédecine et cerveau » passées et présentes pour tous les bons moments de la vie de laboratoire que nous avons partagés. Un grand merci particulier à Annaëlle, Aurélie, Claire et Marie pour tous les très bons moments partagés au laboratoire mais surtout en dehors. Que dire... Annaëlle, merci entre autres pour nos discussions autour de « Ben et Nuts » et notre Californian girls road trip. Que de souvenirs !!! Merci Aurélie et Claire d'avoir été présentes pour cette tranche de vie et pour votre bonne humeur toujours au rendez-vous. Marie, merci simplement pour tout ce que tu m'as apporté. De collègues, nous sommes devenues amies, je vous souhaite à toutes de grandes aventures personnelles et professionnelles.

Je remercie grandement mes deux amies toulousaines elles aussi exilées, Alex et Cécile, pour avoir été là pendant toutes ces années, dans les bons et les mauvais moments. Merci également à mes amis grenoblois, d'adoption ou pur souche, Mumu, Matt, Will, Alexia, Jesa, Dav, Ingrid et Aurélie.

Un grand merci à mon frère et surtout à ma maman pour m'avoir aidée à me construire et à trouver ma voie. Tant de courage et de générosité font ta force... du fond du cœur, merci pour tout.

Enfin, merci à Yann pour ta présence, et surtout pour ta patience et ton soutien sans faille dans les moments difficiles. Je ne me souviens que d'un mur immense. Ensemble, nous l'avons franchi...

A mon père, mon grand-père
et aux souvenirs passés ensemble

Résumé

Les microARN, ARN courts non codants, jouent un rôle primordial dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes. Une modification d'expression de ces ARN peut donc contribuer à la tumorigenèse et au développement tumoral par dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans des processus clés du cancer. Nous avons souhaité mettre en évidence des signatures spécifiques (i) du phénotype d'invasion des méningiomes et (ii) du phénotype d'agressivité des gliomes par étude des oligodendrogliomes (gliomes de bas grade) et glioblastomes (gliomes de haut grade). (i) Les profils d'expression des microARN dans des méningiomes invasifs montrent des différences par rapport à ceux des méningiomes non invasifs ; confirmant l'intérêt de ces explorations moléculaires pour une application diagnostique directe. (ii) Dans le cas des gliomes, plusieurs miARN ont été détectés et validés et constituent des signatures spécifiques des gliomes en comparaison aux échantillons contrôles. Certains permettent également une distinction aisée des oligodendrogliomes et glioblastomes. Des études génomiques et épigénétiques ont été menées pour rationaliser, du point de vue de la physiopathologie des cellules, les différences d'expression des miARN entre les différents tissus. Au niveau du protéome, des dérégulations d'expression de cibles des miARN identifiés ont été mises en évidence comme celles de MDH1, SIRT1, STAT3 ou PTBP1, protéines clés de la physiologie cellulaire et nous avons pu décrire des voies moléculaires pertinentes du développement tumoral des gliomes.

Mots-clés : Gliomes, méningiomes, microARN, étude transcriptomique, régulation d'expression génique, biomarqueurs.

Abstract

MicroRNAs, as short endogenous non-coding RNAs, play an important role in post-transcriptional gene silencing. Altered expression of these miRNAs can contribute to the tumorigenesis and tumour development deregulating the expression of key cancer genes. Our study aimed at highlighting specific signatures (i) of the invasive phenotype of meningiomas (ii) of the aggressive phenotype of gliomas studying oligodendrogliomas (low grade) and glioblastomas (high grade). (i) The invasive phenotype of meningiomas, also established *in vitro*, is supported by deregulation of some miRNAs. (ii) As for gliomas, several miRNAs discriminate gliomas vs control tissues and some can also distinguish oligodendrogliomas and glioblastomas. Genomics and epigenetics studies have been run to analyse the effect of the deregulation of expression of these miRNAs on the tumoural cell physiopathology. Some targets of these miRNAs, MDH1, SIRT1, STAT3 ou PTBP1, which are key cellular proteins, have been highlighted as deregulated. Our work suggests some new interesting pathways implicated in glioma development.

Keywords : gliomas, meningiomas, microRNA, transcriptomic study, regulation of gene expression, biomarkers

Liste des abréviations

Acétyl-CoA	Acétyl-Coenzyme A
ACSS2	Acétyl-Coenzyme A synthétase
Ac-pré-miARN	Ago2-clived-pré-miARN
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
Ago	Argonaute
AKT	Serin/threonin protein kinase
APAF-1	Apoptotic protease-activating factor 1
ARE	AU-rich element
ARE-BP	ARE- binding protein
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférence
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNt	ARN de transfert
ARPP21	AMP-regulated phosphoprotein 21
ATCC	American type culture collection
ATP	Adenosine triphosphate
BAK	BCL2 antagonist/killer
BAX	BCL2-associated X protein
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
Bcl-xl	B-cell lymphoma-extra large
BCNU	Carmustine
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BIC	B-cell receptor inducible
BID	BH3 interaction domain death agonist
BSA	Bovine serum albumin
CA9	Carbonic anhydrase IX
CACNG8	Calcium channel, voltage-dependant, gamma subunit 8
CAF1	CCR4- associative factor 1
CCD	Charged coupled device
CCND1	Cyclin D1
CCNU	Lomustine
CCPG1	Cell cycle progression 1
CCR4	Chemokine receptor 4
CD95L	CD95 ligand
CDK4	Cyclin-dependant kinase 4
CRM1	Chromosome maintenance region 1
CT	Computed tomography
Ct	Cycle threshold

DCP1	Decapping protein 1
DCP2	Decapping protein 2
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region gene 8
DLEU2	Deleted in lymphocytic leukemia 2
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
dNTP	désoxy nucleotide triphosphate
DO	Densité optique
dsRBD	double-strand RNA binding protein
EDC3	Enhancer of mRNA decapping 3
ECL	Enhance chemiluminescent
EFNA1	Ephrin-A1
EGFL7	EGF-like-domain, multiple 7
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGFRvIII	EGFR variant III
eIF4E	Eukaryotic translation initiation factor 4E
eIF4F	Eukaryotic translation initiation factor 4F
eIF6	Eukaryotic translation initiation factor 6
ELOSA	Enzyme linked oligosorbent assay
EMA	Epithelial membrane antigen
EP300	E1A binding protein p300
ERM	Ezrine-Radixine-Meosine
Exp-5	Exportin-5
Exp-t	Exportin-t
FADD	Fas-associated death domain
FAS-L	Fas-ligand
FXR1	Fragile X mental retardation related protein 1
GAX	Growth arrest-specific homebox
GBM ou G	Glioblastome
GDP	Guanine diphosphate
GTP	Guanine triphosphate
GW182	Glycin-tryptophan protein (182kDa)
HIF1 α	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit
HIG2	Hypoxia inducible gene 2 protein
HMGA2	High mobility group AT-hook 2
HOXA5	Homebox A5
HRP	Horseradish peroxydase
HSP60/70	Heat shock protein 60kDa/70kDa
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IARC	International agency for research on cancer
IC	Index cellulaire

IDH1	Isocitrate déshydrogénase 1
IL-1 α	Interleukine 1 α
IL6	Interleukine 6
IPA	Ingenuity pathway analysis
IRES	Internal ribosome entry site
IRM	Imagerie par résonance magnétique
ITGB4	Integrin beta 4
iTRAQ	isobaric tag for relative and absolute quantitation
IVT	In vitro transcription
LNA	Locked nucleic acids
LOX	Lysyl oxidase
m7G	méthyl-7-Guanine
MBD	méthyl-DNA binding
MCM7	Minichromosome maintenance complex component 7
MDA	MD Anderson
MDH1	Malate déshydrogénase 1, NAD (soluble)
MDM2	Mouse double minute 2
MES	Mesenchymateux
MGM	Méningiome
MGMT	O6-méthylguanine-DNA méthyltransférase
miARN	microARN
miRISC	miRNA- RNA induced silencing complex
MMP	Matrix métalloprotéase
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTT	3-(4,5-Diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide
N	Echantillons contrôles
NaBH ₄	Sodium borohydrure
NAPDH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NF2	Neurofibromatose 2
NOT	Negative regulator of transcription
nt	nucléotides
OA	Oligoastrocytome
ODG ou O	Oligodendrogliome
OMS	Organisation mondiale pour la santé
ORF	Open reading frame
PARN	Poly-A specific ribonuclease
PAZ	PIWI/Argonaute/Zwille
pb	paires de bases
p-bodies	Processing-bodies
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction

PDCD4	Programmed cell death 4
PDE2A	Phosphodiesterase 2
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptor
piARN	PIWI-interacting ARN
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-diphosphate
PIP3	Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate
PN	Proneural
pré-miARN	précurseur de miARN
pri-miARN	primary transcript of miARN
PTBP1	Polypyrimidine tract binding protein 1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
PVDF	Polyvinyl diméthyl fluoride
R3HDM1	R3H domain containing 1
RAKE	RNA-primed, array-based Klenow enzyme assay
RAN	Ras-related nuclear protein
RAN-GAP	RAN-GTPase activating protein
Ras	Rat sarcoma virus oncogene
raSiARN	repeat-associated siARN
RB1	Retinoblastoma 1
RCC1	Regulator of chromosome condensation 1
RHA	RNA helicase A
RIN	RNA integrity number
RISC	RNA-induced silencing complex
RLC	RISC-loading complex
RMA	Robust multi-array average
RNA	Ribonucleic acid
RNAse	Ribonucléase
rpm	Rotations par minute
SAGE	Serial analysis of gene expression
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodécyl sulfate- Polyacrylamide gel electrophoresis
siARN	small induced ARN
SILAC	stable isotope labeling with amino acids in cell culture
SIRT1	Sirtuin 1
SLC2A1	Solute carrier family 2 member 1
SNC	Système nerveux central
SNAP25	synaptosomal-associated protein, 25kDa
SNP	Single nucleotide polymorphism
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich
SSC	Saline sodium citrate

STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
stRNA	small temporal RNA
SVF	Sérum de veau foetal
SWOG	South west oncology group
tBID	truncated BID
TBS	Tris buffer saline
TGF β	Transforming growth factor β
THBS1	Thrombospondine 1
TMB	Tetramethylbenzidine
TNF α	Tumor necrosis factor α
TPM1	Tropomyosine 1
TRBP	TAR RNA binding protein
TSS	Transcription starting site (site de début de transcription)
UCSF	University of California, San Francisco
UTR	Untranslated region
UV	Rayons ultraviolets
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

Table des illustrations

Figure 1: Exemple d'Imagerie par Résonance Magnétique	13
Figure 2: Exemple de coupe histologique	13
Figure 3 : Schéma présentant les différentes cellules gliales	14
Figure 4: Structure histologique des différents types de gliomes	16
Figure 5 : Coupe d'une partie du crâne et des méninges.	18
Figure 6 : Schéma d'une coupe verticale de cerveau	18
Figure 7 : Voie de signalisation PI3K/AKT	20
Figure 8 : Voies génétiques impliquées dans la tumorigenèse des oligodendrogliomes et glioblastomes primaires et secondaires	23
Figure 9 : Modèle de régulation du développement larvaire de <i>C. elegans</i> par lin-4 et let-7	29
Figure 10 : Nombre de publications sur les miARN ces neuf dernières années	30
Figure 11 : Mécanisme de biogenèse des microARN	32
Figure 12 : Comparaison entre les miARN, les siARN et les piARN	35
Figure 13 : Localisation des gènes codant pour les miARN	36
Figure 14 : Maturation du pri-miARN en pré-miARN par le complexe Drosha/DGCR8	38
Figure 15 : Voie des « mirtrons »	39
Figure 16 : Mécanisme d'export du pré-miARN du noyau vers le cytoplasme	40
Figure 17 : Clivage du pré-miARN par Dicer	41
Figure 18 : Formation du complexe miRISC	44
Figure 19 : Conformation des protéines Argonaute	45
Figure 20 : Interaction entre miARN et ARNm cible chez les métazoaires	47
Figure 21 : Les trois catégories de sites cibles : canoniques, marginaux et atypiques	48
Figure 22 : Différents mécanismes de régulation de l'expression d'ARNm cibles par les miARN	55
Figure 23 : Implication des miARN dans le processus d'apoptose	69
Figure 24 : Principe des chambres de Boyden	76
Figure 25 : Détection des marqueurs Vimentine et EMA dans les cellules primaires de méningiomes invasifs et non invasifs	94
Figure 26 : Cellules colorées au MTT après invasion du Matrigel	95
Figure 27 : Pourcentages de migration et d'invasion des cellules primaires de méningiomes invasifs et non invasifs	96
Figure 28 : Profils des index cellulaires normalisés en fonction du temps obtenus sur E-plate 16	97
Figure 29 : Etude du phénotype invasif de cellules invasives sur différents « coatings » de Matrigel en présence ou non de chimioattractant	98
Figure 30 : Migration et invasion de cellules invasives et non invasives	99
Figure 31 : Regroupement hiérarchique des méningiomes invasifs et non invasifs	100
Figure 32 : Gènes surexprimés dans les méningiomes invasifs codant pour des protéines impliquées dans la prolifération, l'adhésion et la motilité cellulaire	101
Figure 33 : Exemple de séquençage centré sur le codon 132 de IDH1	105
Figure 34 : Représentation graphique des ratios d'expression des 26 marqueurs des gliomes obtenus par la méthode de PCR quantitative	107
Figure 35 : Exemple de représentation graphique des valeurs de dosage dans les ODG, GBM et échantillons contrôles de 4 miARN	111
Figure 36 : Exemples de représentation graphique de classement des échantillons à partir de deux ratios d'expression	112

Figure 37 : Analyse génomique par PCR des loci codant les miARN marqueurs des gliomes.....	113
Figure 38 : Etude de méthylation des promoteurs.....	116
Figure 39 : Détection par western blot de quelques protéines cibles des miARN d'intérêt marqueurs des gliomes	118
Figure 40 : Rationalisation des fonctions des miARN d'intérêt dans le développement tumoral des gliomes et interaction avec leurs protéines cibles	127
Figure 41 : Voies métaboliques impliquant SIRT1, IDH1 et MDH1, protéines dérégulées dans les gliomes	129
Figure 42 : Profils d'électrophorèse miniature après migration des ARN courts (A) et longs (B) sur puce Agilent RNA Nano 6000	157
Figure 43 : Principe de la synthèse d'oligonucléotides par photolithographie	158
Figure 44 : Principe des deux étapes de la RT-PCR quantitative selon le protocole d'Applied Biosystems permettant le dosage des ARN matures	159
Figure 45 : Exemple de courbes d'amplification obtenues par PCR quantitative	159
Figure 46 : Principe du marquage des ARN courts par le kit FlashTag Biotin HSR labeling kit (Genisphere) et détection des signaux.....	160
Figure 47 : Principe des quatre étapes du pyroséquençage	163
Tableau 1 : Outils bioinformatiques pour la prédiction de sites cibles chez les métazoaires	49
Tableau 2 : Liste des marqueurs des groupes de gliomes « proneuraux » (PN) et « mésenchymateux » (MES)	82
Tableau 3 : Liste des sondes permettant de distinguer les groupes O et G	83
Tableau 4 : Détails sur les différents anticorps primaires dosés en western-blot.	93
Tableau 5 : Classement des 25 échantillons selon les classifications de Phillips et Li.....	104
Tableau 6 : 26 miARN marqueurs des gliomes.	107
Tableau 7 : Ratios d'expression des 26 marqueurs entre glioblastomes G, oligodendrogliomes O et échantillons contrôles N et comparaison entre méthode d'hybridation sur puces Affymetrix de type U133 Plus 2.0 et PCR quantitative.	109
Tableau 8 : miARN brevetés classés en cinq groupes selon les échantillons qu'ils permettent de distinguer.	110
Tableau 9 : Ratios d'expression permettant le diagnostic des gliomes.....	112
Tableau 10 : Expression des gènes hôtes dans les deux types de gliomes et corrélation avec l'expression des miARN.....	115
Tableau 11 : Niveaux d'expression des protéines cibles et des ARNm qui les codent.	119
Tableau 12 : Echantillons tissulaires utilisés pour cette étude, à savoir des glioblastomes, des tumeurs oligodendrogliales et des méningiomes comme tissus tumoraux et des échantillons contrôles.	156
Tableau 13 : Séquences des amorces, tailles des amplicons et température d'hybridation pour la PCR génomique.	161
Tableau 14 : Séquences des amorces, tailles des amplicons, concentrations de MgCl ₂ et températures d'hybridation pour la PCR préalable au pyroséquençage.	162

Table des matières

INTRODUCTION

Partie I- Les tumeurs cérébrales	12
I- Epidémiologie, diagnostic et classification générale.....	12
II- Les tumeurs gliales et les méningiomes	14
1. Données épidémiologiques et cliniques.....	14
a. Tumeurs gliales	14
b. Méningiomes	17
2. Physiopathologie moléculaire et cellulaire	19
a. Glioblastomes	19
b. Oligodendrogliomes	22
c. Méningiomes	24
3. Traitement des tumeurs gliales et des méningiomes	25
a. La chirurgie	25
b. La radiothérapie.....	26
c. La chimiothérapie	27
d. Nouveaux essais de thérapie ciblée	27
e. Nouvelles stratégies thérapeutiques	28
Partie II- Les microARN (miARN).....	29
I- Généralités sur les miARN	29
1. Découverte des miARN	29
2. Nomenclature des miARN	31
3. Comparaison avec les autres acteurs de l'ARN interférence.....	33
II- Biogenèse des miARN.....	35
1. Localisation et structure des gènes codant les miARN.....	35
2. Transcription des transcrits primaires	37
3. Maturation des transcrits primaires en miARN	37
a. Formation du pré-miARN dans le noyau	37
b. Export du pré-miARN du noyau vers le cytoplasme.....	39
c. Production du miARN mature dans le cytoplasme	40
III- Mécanismes de régulation de l'expression génique par les miARN	42
1. Prise en charge du miARN par le Risc loading complex (RLC) et formation du complexe miRISC	42
2. Interaction miARN/ARNm et sites cibles	45
a. Mécanismes d'interaction entre le miARN et l'ARNm cible.....	45
b. Catégories de sites cibles.....	47
c. Outils bioinformatiques pour la prédiction de sites cibles	49
3. Régulation de l'expression des ARNm cibles par les miARN	50
a. Généralités sur les ARNm : maturation, stabilité et traduction.....	50
b. Répression de l'initiation de traduction par les miARN	51
c. Répression de l'étape de post-initiation de la traduction par les miARN	52
d. Régulation par dégradation des ARNm cibles	53
e. Cas particuliers d'activation de traduction	56
IV- Les miARN dans le processus de tumorigenèse et de développement tumoral	57
1. Modifications des profils d'expression des miARN dans le cancer	57
a. Profils d'expression des miARN dans différents types de cancer.....	57
b. Dérégulations de l'expression des miARN par défauts dans le mécanisme de biogenèse.....	58

c. Dérégulations de l'expression des miARN par réarrangement chromosomique	59
d. Dérégulations de l'expression des miARN à cause de mutations ponctuelles	59
e. Dérégulations de l'expression des miARN par régulation transcriptionnelle	60
2. Modifications affectant l'hybridation miARN/ARNm cible	62
a. Dérégulations par modification chromosomique	62
b. Dérégulations par mutations ponctuelles.....	62
3. miARN oncogènes et suppresseurs de tumeur	64
a. miARN oncogènes.....	64
b. miARN suppresseurs de tumeur	65
4. miARN impliqués dans les voies moléculaires du développement tumoral	66
a. Processus d'apoptose et de prolifération cellulaire	66
b. Processus d'angiogenèse	70
Partie III- Présentation et objectifs de la thèse	71
MATERIEL ET METHODES	
I. Matériel utilisé	73
1. Echantillons tissulaires	73
2. Lignées cellulaires	74
3. Cultures primaires de méningiomes	74
II. Méthodes	74
1. Caractérisation par immunofluorescence des cultures primaires de méningiomes	74
2. Test phénotypiques d'invasion des cellules.....	75
a. Chambres de Boyden.....	75
b. Système de mesure d'impédance.....	77
3. Extraction des acides nucléiques et protéines.....	78
a. Extraction des acides nucléiques	78
b. Extraction des protéines	79
4. Analyse de l'expression des ARNm par hybridation sur puce Affymetrix de type U133 Plus 2.0	79
a. Principe de la méthode	79
b. Normalisation et analyse des résultats.....	80
5. Caractérisation moléculaire des glioblastomes et oligodendrogliomes.....	80
a. Classification par analyse sur puce Affymetrix de type U133 Plus 2.0	80
b. Analyse mutationnelle du gène codant pour IDH1	85
6. Analyse du taux d'expression des miARN	86
a. Par la méthode d'hybridation sur membranes « à façon »	86
b. Par la méthode de PCR quantitative.....	86
c. Par la méthode d'hybridation sur puces Affymetrix de type miRNA Genechip®	87
7. Analyse d'altérations génétiques par PCR génomique et séquençage	89
8. Etude de méthylation des promoteurs des miARN.....	90
9. Recherche <i>in silico</i> des ARNm cibles.....	91
10. Western-blot	92
11. Rationalisation des données et mise en évidence de nouvelles voies moléculaires	93
RESULTATS	
Partie I- Etude du phénotype d'invasivité des méningiomes	94
I- Caractérisation des échantillons mis en culture.....	94
1. Détection des marqueurs spécifiques, l'EMA et la Vimentine par immunofluorescence	94
2. Tests phénotypiques d'invasion.....	95
a. Chambres de Boyden.....	95
b. Système de mesure d'impédance.....	97

II-	Recherche de marqueurs du phénotype invasif des méningiomes	99
1.	Recherche de biomarqueurs de type ARNm.....	99
2.	Recherche de biomarqueurs de type miARN	101
3.	Recherche des cibles de miR-145, marqueur potentiel du phénotype invasif des méningiomes.....	102
Partie II-	Etude des miARN dans l'analyse physiopathologique des gliomes	103
I-	Sélection des échantillons de gliomes pertinents pour l'analyse.....	103
1.	Comparaison avec deux méthodes de classification des gliomes.....	103
2.	Analyse mutationnelle du gène codant pour IDH1	105
II-	Analyse du taux d'expression des miARN dans les glioblastomes et oligodendrogliomes	106
1.	Analyse par les méthodes d'hybridation sur membranes « à façon » et PCR quantitative	106
2.	Analyse par la méthode d'hybridation sur puces Affymetrix de type miRNA Genechip®	108
a.	Validation des 26 marqueurs précédemment décrits	108
b.	Recherche de biomarqueurs pour une application au diagnostic	109
III-	Rationalisation des dérégulations d'expression des miARN dans les gliomes	113
1.	Altérations génétiques.....	113
2.	Expression des gènes hôtes.....	114
3.	Modifications épigénétiques	115
4.	Hypoxie.....	117
IV-	Analyse des cibles des miARN marqueurs des gliomes.....	117
DISCUSSION ET PERSPECTIVES		
I-	Etude du phénotype invasif des méningiomes.....	120
II-	Les miARN comme outils diagnostiques des gliomes	121
III-	Rationalisation des différences d'expression des miARN dans les gliomes	122
IV-	Fonction des miARN dans les tumeurs gliales	125
V-	Les miARN comme outils thérapeutiques ?	129
BIBLIOGRAPHIE		131
ANNEXES		156

Introduction

Partie I- Les tumeurs cérébrales

I- Epidémiologie, diagnostic et classification générale

Les tumeurs cérébrales sont des tumeurs du système nerveux central (SNC) et représentent 2% des cas de cancer chez l'adulte avec une incidence de 4 cas pour 100000 habitants dans le monde et 5,6 cas pour 100000 habitants en France (Globocan, IARC). Ce sont les plus fréquentes des tumeurs solides chez l'enfant. Ces tumeurs, bénignes ou malignes, résultent d'une prolifération anormale de cellules gliales, arachnoïdiennes ou endothéliales dans le cerveau. Les tumeurs cérébrales peuvent également être le résultat de métastases de tumeurs extra-crâniennes (cancer du poumon ou du sein par exemple). Les tumeurs cérébrales bénignes sont le siège d'une prolifération lente de cellules et les tumeurs malignes, classées « cancéreuses », croissent rapidement, et peuvent envahir et endommager les structures cérébrales.

Les manifestations cliniques de ces tumeurs dépendent essentiellement de la localisation et du volume de la masse tumorale. Ces tumeurs peuvent être la cause d'une hypertension intracrânienne accompagnée d'une hydrocéphalie et engendrer des symptômes tels que des maux de têtes, vertiges, nausées, troubles visuels et auditifs, voire des convulsions, des troubles du comportement ou des dysfonctionnements neurologiques importants (crises épileptiques par exemple).

Les premiers examens menés sont à l'heure actuelle basés sur des méthodes radiologiques telles que le CT-scanner (Computed tomography) et l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique). Le scanner met en évidence, après injection d'agent de contraste (comme par exemple les produits iodés hydrosolubles bloquant les rayons X), la localisation de la tumeur, l'œdème péri-tumoral et permet d'évaluer la masse tumorale. L'IRM, ayant une meilleure sensibilité de contraste, est souvent complémentaire du scanner. Cette technique permet la visualisation des tissus mous, de préciser l'anatomie et la localisation des lésions tumorales mais également de montrer les limites de ces lésions et les rapports avec les structures environnantes. Dans ce cas, l'agent de contraste utilisé doit avoir des propriétés paramagnétiques, comme c'est le cas pour le gadolinium, très souvent utilisé.

Un exemple d'oligodendrogliome mis en évidence par IRM est présenté sur la figure 1.

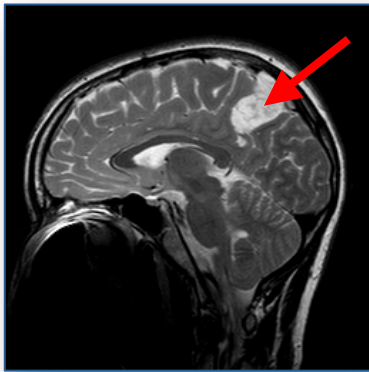


Figure 1: Exemple d'Imagerie par Résonance Magnétique.

Oligodendrogliome se développant dans la substance blanche en suivant le gyrus cortical.

Pour élaborer un diagnostic plus fiable, il est nécessaire par la suite d'effectuer une intervention chirurgicale telle que la biopsie ou l'exérèse complète de la tumeur suivie d'une analyse morphologique du fragment prélevé au microscope par des anatomopathologistes. Cette analyse permet par exemple de mettre en évidence quelques caractéristiques des glioblastomes telles qu'une forte densité cellulaire, la présence de nombreuses mitoses, de zones de nécrose entourées par un arrangement palissadique des cellules tumorales ou encore de nombreux vaisseaux avec prolifération endothéliale (Figure 2).

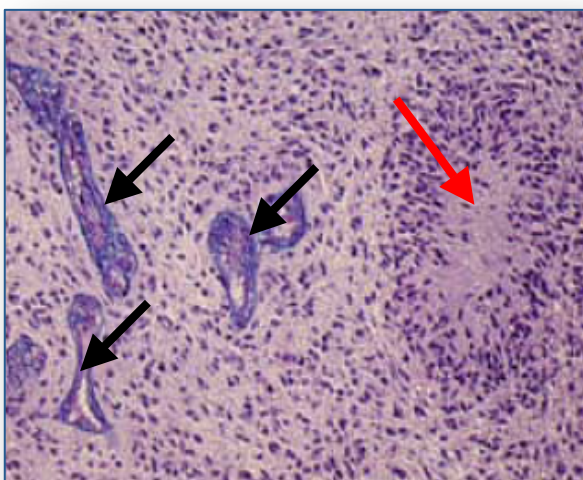


Figure 2: Exemple de coupe histologique.

Coupe histologique de glioblastome sur laquelle sont présentés une plage de nécrose entourée de cellules tumorales en pseudo-palissades (flèche rouge) et des vaisseaux avec prolifération endothéliale (flèches noires).

De manière simplifiée, sur la base de ces critères histologiques et cellulaires, on distingue : les tumeurs d'origine hématopoïétique (lymphomes cérébraux), les tumeurs germinales, les tumeurs de la région sellaire (adénomes hypophysaires), des nerfs périphériques (neurofibromes) mais principalement les tumeurs des méninges (dont les méningiomes) et les tumeurs neuroépithéliales (dont les tumeurs gliales).

II- Les tumeurs gliales et les méningiomes

1. Données épidémiologiques et cliniques

a. Tumeurs gliales

Les gliomes ou tumeurs gliales représentent plus de 40% des tumeurs du SNC et constituent une cause importante de morbidité et de mortalité puisqu'elles représentent la deuxième cause de mortalité par cancer chez les enfants de moins de 15 ans et la troisième chez les personnes âgées de 15 à 34 ans. Ces tumeurs se développent au niveau de la glie, tissu de soutien du système nerveux, et plus précisément aux dépens des cellules macrogliales, comme les astrocytes et oligodendrocytes. Ces cellules ont un rôle essentiel pour le bon fonctionnement des neurones puisque les astrocytes, de forme étoilée, jouent un rôle dans l'alimentation des neurones et dans la propagation du signal nerveux, et les oligodendrocytes, sont à l'origine des gaines de myéline entourant les axones des fibres nerveuses (Figure 3).

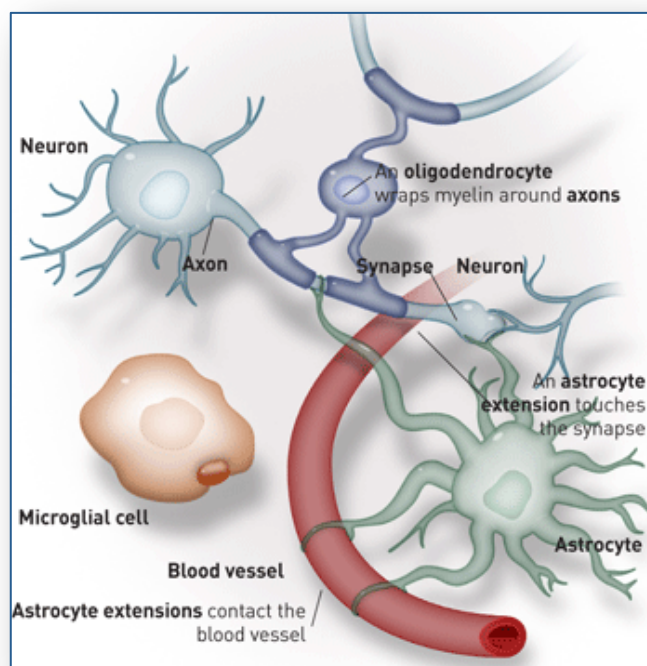


Figure 3 : Schéma présentant les différentes cellules gliales.

On trouve principalement les astrocytes et oligodendrocytes ayant un rôle dans la nutrition et la protection des neurones respectivement.

Il existe actuellement deux classifications de ces tumeurs : celle de l'OMS, mise à jour en 2007 (Louis *et al.*, 2007), reposant sur des critères exclusivement morphologiques et celle de l'Hôpital Sainte-Anne (Paris), classification française qui repose à la fois sur l'examen anatomo-pathologique mais également sur l'analyse des images IRM et des données cliniques (Daumas-Duport *et al.*, 2000).

Selon l'OMS, 4 grades peuvent être définis selon leur degré de malignité et donc par leur capacité à envahir le parenchyme cérébral :

- Grade I : astrocytome pilocytique
- Grade II : astrocytomes fibrillaires, oligoastrocytomes et oligodendrogliomes
- Grade III : astrocytomes, oligoastrocytomes et oligodendrogliomes anaplasiques
- Grade IV : glioblastome

Les astrocytomes pilocytiques sont bénins et très fréquents chez les enfants et l'exérèse tumorale par chirurgie permet souvent la guérison. Les astrocytomes fibrillaires présentent un pouvoir invasif encore modéré mais la chirurgie permet difficilement la résection complète et la médiane de survie est d'environ une dizaine d'années. Les astrocytomes anaplasiques sont des tumeurs malignes avec un pouvoir invasif plus important et la médiane de survie des patients est de l'ordre de 2 à 3 ans. Quant aux astrocytomes de plus haut grade, les glioblastomes, ils représentent près de 50% de l'ensemble des gliomes et présentent des caractères de malignité importants tels qu'une prolifération incontrôlée (2 à 5 fois plus importante que dans les astrocytomes de grade inférieur), une vascularisation importante ainsi que des zones de nécrose. Dans ce cas, la médiane de survie des patients est inférieure à un an et le taux de survie à 5 ans est de 3% alors qu'il est dix fois plus élevé pour les astrocytomes anaplasiques. Dans le cas des glioblastomes, le taux de récurrence est de 90% après acte chirurgical.

Selon la classification de l'OMS, les fréquences de détection des trois types de tumeurs sont grossièrement les suivantes : <10% pour les oligoastrocytomes, de 10 à 30% pour les oligodendrogliomes et de 60 à 70% pour les astrocytomes.

Cependant, cette classification présente quelques inconvénients. En effet, elle prend en compte des données histologiques uniquement et n'intègre pas les données cliniques et d'imagerie. Ceci entraîne donc un manque de reproductibilité intra et inter anatomopathologiste. Ce manque de reproductibilité est d'une part dû au fait que les paramètres histologiques sont très nombreux dont certains sont contradictoires et d'autre part

dû au fait que cette classification ne tient pas compte de l'hétérogénéité tumorale et de l'infiltration du parenchyme par les cellules tumorales.

Pour pallier les problèmes de reproductibilité de cette classification OMS, une classification originale a été proposée par le Dr Daumas Duport, couramment référencée comme classification de l'Hôpital Sainte-Anne (Daumas-Duport *et al.*, 2000). Pour l'élaboration de celle-ci, des biopsies étagées stéréotaxiques ont été étudiées histologiquement et une corrélation entre histologie et imagerie IRM a été établie. Cela a permis de mettre en évidence la structure spatiale des différents types de gliomes, qu'ils soient solides, infiltrants ou mixtes (Figure 4).


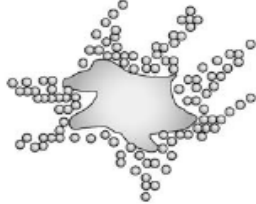
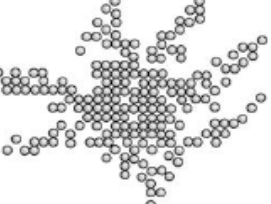
Structure spatiale	Tissu tumoral (TT)	Tissu tumoral (TT) et cellules tumorales isolées	Cellules tumorales isolées
			
Aspect à l'IRM	Prise de gadolinium	Prise de gadolinium (TT uniquement)	Pas de prise de gadolinium hypo-intense en T1 hypo-intense en T2
Principaux types tumoraux	Astrocytome pilocytique	Glioblastome Oligodendrogliome et oligoastrocytome	Oligodendrogliome et oligoastrocytome

Figure 4: Structure histologique des différents types de gliomes.

Le tissu tumoral solide est formé uniquement de cellules tumorales et est accompagné d'une microangiogenèse entraînant une prise de contraste à l'imagerie IRM. Les tumeurs infiltrantes sont constituées de cellules tumorales isolées, dans le parenchyme morphologiquement et fonctionnellement intact. Dans ce cas, il n'y a pas de microvascularisation se traduisant par une absence de prise de contraste à l'imagerie.

Deux grades sont ainsi définis comme suit :

- Grade A : absence de prise de contraste et d'hyperplasie endothéliale (survie médiane de 11 ans)
- Grade B : prise de contraste et/ou hyperplasie endothéliale (survie médiane de 3,5 ans)

Dans cette classification, seuls les astrocytomes pilocytiques sont considérés comme gliomes solides non infiltrants et parmi les gliomes avec une composante infiltrante, trois catégories sont définies :

- Oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade A (structure infiltrante pure)
- Oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade B (structure mixte)
- Glioblastomes (structure mixte)

Enfin, en marge de ces classifications, sur le plan clinique, on distingue deux types de glioblastomes, les glioblastomes primaires et les glioblastomes secondaires, suivant si la tumeur s'est formée directement (*de novo*) ou si elle découle de la transformation progressive d'une tumeur de grade plus faible (astrocytome diffus de grade II ou astrocytome anaplasique de grade III). Environ 5% des cas de glioblastomes sont des glioblastomes secondaires (Dropcho et Soong, 1996) et affectent principalement des sujets jeunes (âge moyen \approx 45 ans), contrairement aux glioblastomes primaires (âge moyen \approx 62 ans). Le temps d'évolution entre un astrocytome de grade II et un glioblastome secondaire est d'environ 5 ans alors qu'il n'est que d'environ 1 an entre un astrocytome de grade III et un glioblastome secondaire (Ohgaki et Kleihues, 2007).

Il est enfin possible de classer les types de tumeurs selon des critères purement moléculaires. Les analyses du transcriptome permettent notamment de proposer un regroupement des gliomes en divers types et sous-types sur la base des taux d'expression d'ensembles de gènes limités (Phillips *et al.*, 2006 ; Li *et al.*, 2009) (pour plus de détails cf Matériel et méthodes et Résultats partie II).

b. Méningiomes

Les méningiomes représentent les secondes tumeurs du SNC les plus fréquentes chez l'adulte avec environ 20% des cas ; ces tumeurs apparaissant chez des patients âgés de 20 à 60 ans environ et observées plus fréquemment chez les femmes (ratio 3:2). Les méningiomes résultent d'une prolifération anormale de cellules arachnoïdiennes et se présentent généralement sous la forme de nodules rattachés à la dure-mère, membrane la plus externe des trois membranes constituant les méninges avec la pie-mère et l'arachnoïde. La pie-mère est la membrane qui adhère à la surface du cerveau alors que l'arachnoïde tapisse la face interne de la dure-mère (Figure 5).

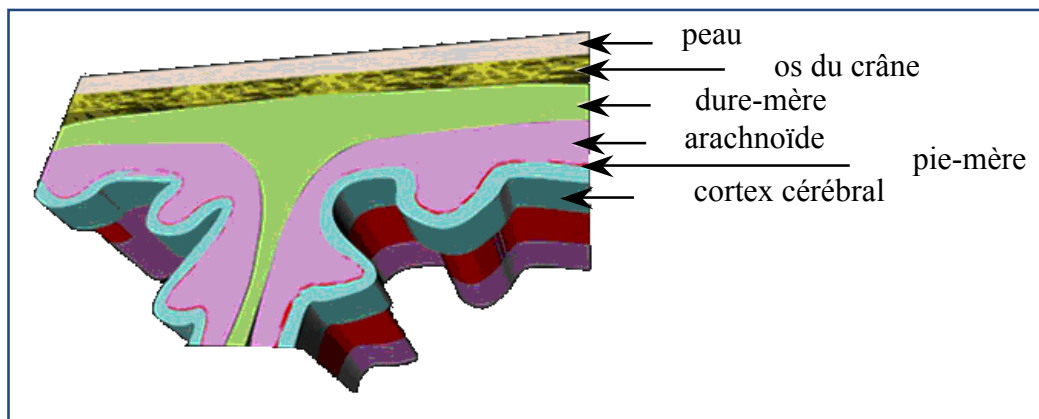
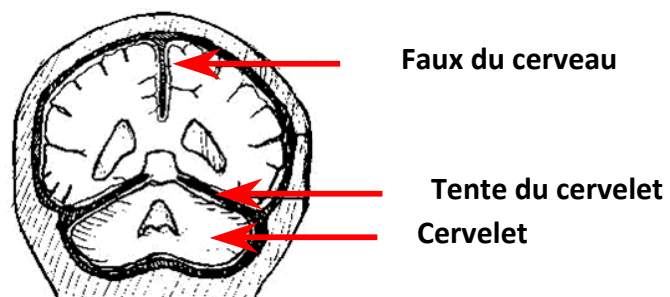


Figure 5 : Coupe d'une partie du crâne et des méninges.

Les méningiomes se développent donc en position intracrânienne mais extra cérébrale, de telle sorte qu'en principe, ils repoussent le tissu cérébral sans l'envahir. Ces tumeurs peuvent apparaître soit à la base, soit sous la voûte du crâne, mais aussi aux dépens des cloisons méningées proprement dites : la tente du cervelet, qui sépare le cerveau du tronc cérébral et du cervelet et la faux du cerveau qui sépare l'hémisphère droit du cerveau de l'hémisphère gauche (Figure 6).

Figure 6 : Schéma d'une coupe verticale de cerveau



On distingue plusieurs types de méningiomes, se différenciant par leur « architecture » et les caractères cytologiques de la prolifération, classés selon l'OMS en trois grades (Louis *et al.*, 2007). Les types les plus fréquemment observés sont les méningiomes méningothéliomateux, fibroblastiques et transitionnels, tous trois de grade I. Six autres types sont classés en grade I (psammomateux, angiomateux, microkystique, sécrétant, riche en lymphocytes et métaplasiques). Les méningiomes atypiques, chordoïdes et à cellules claires sont, quant à eux, classés en grade II et les méningiomes rhabdoïdes, papillaires et anaplasiques en grade III.

Bien que la majorité des méningiomes soient considérés comme bénins (grade I), environ 20% présentent des signes de malignité tels qu'une vascularisation importante, une perte de différenciation, des nucléoles proéminents et l'apparition de nécrose. Concernant le risque de récurrence, pour les tumeurs de grade I, il est de 3% à 5 ans alors que pour les grades II et III, il y a respectivement 38% et 78% de récurrence à 5 ans (Jaaskelainen *et al.*, 1986). Un des facteurs du risque de récurrence est l'invasivité du cortex cérébral adjacent (invasivité corticale) puisque 36% des tumeurs avec invasivité corticale récidivent contre 1% seulement sans invasivité corticale (Mantle *et al.*, 1999). D'autres types d'invasivité ont été décrits tels que l'invasivité osseuse ou l'invasivité durale (Gay, 2004). Concernant l'invasivité osseuse, elle a été rapportée en 1799 par Matthew Baillie qui décrit le méningiome à invasivité osseuse comme une tumeur qui grossit à partir de la dure-mère et qui est associée à l'envahissement intra-osseux du crâne. L'invasivité durale, quant à elle, concerne l'invasivité de la dure-mère.

2. Physiopathologie moléculaire et cellulaire

Plusieurs études ont été menées ces dernières années pour mieux comprendre les altérations génétiques et voies moléculaires impliquées dans l'oncogenèse des gliomes et des méningiomes.

a. Glioblastomes

L'altération génétique la plus courante dans les glioblastomes, qu'ils soient primaires ou secondaires, est une perte d'hétérozygotie du chromosome 10q alors que la perte d'hétérozygotie du chromosome 10p est plus typique des glioblastomes primaires, tout comme la perte du chromosome 10 dans son ensemble (Ohgaki et Kleihues, 2007). D'autres altérations ont également été décrites comme plus typiques des glioblastomes primaires ou des glioblastomes secondaires.

Par exemple, dans les glioblastomes primaires, on peut observer une activation de la voie de signalisation PI3K/AKT due principalement à une surexpression de l'EGFR (40% des glioblastomes primaires) ou à une inactivation de PTEN (25% des glioblastomes primaires). En effet, l'EGFR devient actif après fixation des facteurs de croissance et recrute PI3K à la membrane cellulaire une fois activé. Cette protéine PI3K a pour rôle de phosphoryler PIP2 en PIP3 qui active des molécules effectrices telles que AKT ou mTOR ; cette voie de phosphorylation étant inhibée par la protéine PTEN. AKT inhibe l'apoptose et favorise la

prolifération cellulaire, son activation suite à une augmentation de l'EGFR et/ou une inactivation de PTEN entraîne donc par la suite une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire. Cependant, dans quelques cas de glioblastomes, notamment dans les cas de glioblastomes pédiatriques, l'amplification de l'EGFR est rare voire absente mais on retrouve la présence d'un variant de l'EGFR, l'EGFRvIII, présentant une délétion de deux exons. L'activation constitutive de ce variant entraîne la même cascade de réactions décrite précédemment entraînant la prolifération et la survie des cellules tumorales. La voie de signalisation PI3K/AKT est présentée sur la figure 7.

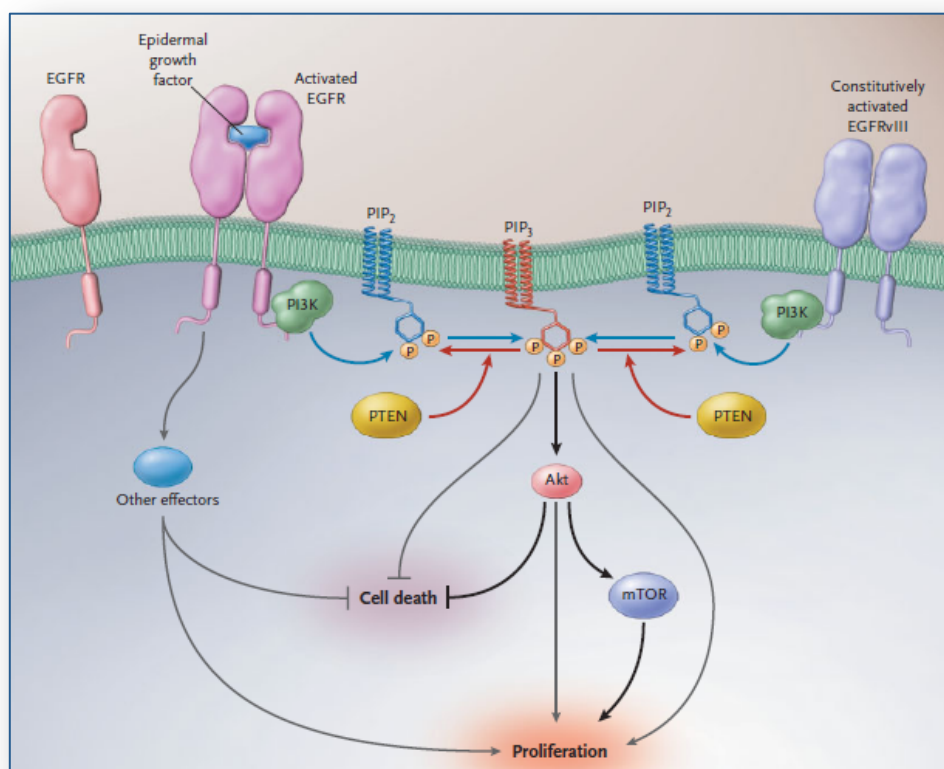


Figure 7 : Voie de signalisation PI3K/AKT (Selon Mellinghoff *et al.*, 2005).

Une fois l'EGF (Epidermal growth factor) fixé au récepteur EGFR, l'enzyme PI3K est recrutée à la membrane cellulaire pour convertir PIP2 en PIP3. Cette molécule PIP3 entraîne ensuite l'activation d'un certain nombre d'effecteurs comme AKT et mTOR, effecteurs induisant une prolifération cellulaire et bloquant l'apoptose. PTEN, quant à elle, est l'enzyme impliquée dans la déphosphorylation de PIP3.

Cette voie peut également être activée suite à une activation constitutive d'un variant de l'EGFR, l'EGFRvIII.

Une des altérations génétiques plus fréquemment observées dans les glioblastomes secondaires est une mutation du gène TP53 codant pour le suppresseur de tumeur p53

(fréquence de 65% dans les glioblastomes secondaires vs 30% dans les glioblastomes primaires) (Ohgaki et Kleihues, 2007). Cette protéine p53 joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire puisqu'elle est capable, suite à une agression génotoxique, en activant la transcription de plusieurs gènes, de bloquer le cycle cellulaire en phase G1 mais également d'induire la mort par apoptose des cellules ou d'induire la réparation de l'ADN suivant les dégâts causés (Vousden *et al.*, 2002). L'inactivation de p53 par mutation ponctuelle entraîne donc une perte de ce « check-point » en phase G1 et engendre des aberrations chromosomiques à l'origine de la tumorigenèse des glioblastomes. La voie de p53 peut également être inactivée par amplification de MDM2 qui entraîne la dégradation de p53 (Furnari *et al.*, 2007). Une telle amplification est observée dans environ 10% des glioblastomes primaires ne présentant pas de mutation dans le gène TP53 (Reifenberger *et al.*, 1993).

Une autre voie de signalisation, p16/RB1, est également impliquée dans la tumorigenèse des glioblastomes primaires et secondaires. Plusieurs altérations de p16 ont été mises en évidence dans les glioblastomes primaires et secondaires. Ces altérations peuvent être une délétion homozygote du gène suppresseur p16 (plus fréquente dans les glioblastomes primaires) ou une forte méthylation de son promoteur (plus fréquente dans les glioblastomes secondaires) (Nakamura *et al.*, 2001a). On retrouve également une méthylation importante du promoteur du gène RB1 dans 40% des glioblastomes secondaires et seulement 15% des glioblastomes primaires, hyperméthylation très souvent associée à une perte d'expression de la protéine RB1 (Nakamura *et al.*, 2001b).

La protéine RB1 est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et notamment dans le contrôle de la progression de la phase G1 à la phase S. Elle est hypophosphorylée dans les cellules quiescentes et séquestre le facteur de transcription E2F. Sa phosphorylation par le complexe CyclinD1/CDK4 entraîne la libération de E2F, libération induisant la transcription de gènes qui vont promouvoir l'avancée dans le cycle cellulaire (Sherr et Roberts, 1999). Cette protéine RB1 joue donc un rôle de contrôle négatif de la prolifération par sa liaison à E2F et ce rôle peut être aboli, soit par la phosphorylation de RB1 après amplification de CDK4 principalement, soit par inactivation du gène RB1 (par hyperméthylation par exemple). Le rôle de p16 est d'inhiber l'action du complexe CyclinD1/CDK4 par liaison avec CDK4 et donc d'inhiber la transition de la phase G1 à la phase S.

On retrouve également dans les glioblastomes l'inactivation d'autres gènes par hyperméthylation de leurs promoteurs, notamment le gène de la méthylguanine

méthyltransférase (MGMT). Une telle hyperméthylation est retrouvée dans 75% des glioblastomes secondaires et dans seulement 35% des glioblastomes primaires (Nakamura *et al.*, 2001c). MGMT est une enzyme de réparation qui ôte spécifiquement les groupements alkyles promutagéniques présents dans l'ADN et permet donc de protéger les cellules de la carcinogenèse induite par des agents alkylants. Cette réparation par les cellules tumorales est donc impliquée dans la chimiorésistance envers les traitements alkylants tels que le temozolomide, souvent utilisé en chimiothérapie des glioblastomes. Les patients dont le gène MGMT est méthylé sont donc plus chimiosensibles aux agents alkylants que ceux ayant le gène non méthylé (Esteller *et al.*, 2000). Il a également été montré qu'il existe une corrélation entre l'hyperméthylation de ce promoteur et la présence de mutations du gène TP53 (Nakamura *et al.*, 2001c). En effet, plus de 90% des astrocytomes présentant une hyperméthylation du promoteur MGMT ont une mutation dans le gène TP53 alors que seulement 40% des cas ne présentant pas cette hyperméthylation portent la mutation du gène TP53. Les deux voies génétiques à l'origine des glioblastomes primaires et secondaires sont présentées sur la figure 8 (Ohgaki *et al.*, 2004).

b. Oligodendrogliomes

Une des altérations les plus fréquentes dans les oligodendrogliomes est la codélétion 1p et 19q (Reifenberger *et al.*, 1994), codélétion très spécifique de ce type tumoral puisque retrouvé dans 75% des oligodendrogliomes et dans seulement 10% des tumeurs astrocytaires (Smith *et al.*, 1999). Ces événements semblent survenir précocement dans leur tumorigenèse puisqu'ils sont retrouvés aussi bien dans les oligodendrogliomes de bas grade (grade II) que dans les oligodendrogliomes anaplasiques (grade III). Dans les oligodendrogliomes est fréquemment retrouvée une mutation au niveau du gène codant pour l'isocitrate deshydrogénase cytosolique, IDH1, et ce dans près de 70% des cas. Cette mutation est également présente dans les astrocytomes de grades II et III dans près de 50% des cas, ainsi que dans les glioblastomes secondaires (50%) mais très rarement dans les glioblastomes primaires (6%) (Balss *et al.*, 2008; Ichimura *et al.*, 2009). Cette mutation unique, entraînant le remplacement de l'arginine en position 132 en histidine, engendre une incapacité de cette enzyme à catalyser la décarboxylation de l'isocitrate en α -cétoglutarate et donc à produire du NADPH, nécessaire dans le mécanisme de défense en cas de stress oxydatif. Cette mutation n'est pas retrouvée dans les cancers affectant d'autres organes que le cerveau, ceci pouvant

être expliqué par une forte pression de sélection due à des niveaux de stress oxydatifs plus importants dans le cerveau que dans les autres organes.

D'autres altérations génétiques, fréquentes dans les tumeurs astrocytaires, sont également présentes dans les oligodendrogliomes à une fréquence plus faible. C'est le cas par exemple des délétions du chromosome 10q dans environ 35% de ces tumeurs, de l'amplification de l'EGFR dans 5-20% des cas ou encore des délétions de p16/CDK4 dans moins de 30% des cas (Reifenberger *et al.*, 1996, Sato *et al.*, 1996, Hoang-Xuan *et al.*, 2001). De plus, les mutations de P53, très fréquentes dans les glioblastomes, sont rares dans les oligodendrogliomes puisque rapportées dans 4-15% des cas (Ohgaki *et al.*, 1991, Hoang-Xuan *et al.*, 2001).

Deux voies de tumorigenèse principales ont été mises en évidence dans les oligodendrogliomes (Figure 8). La première voie est identifiée par la codélétion 1p19q entraînant le développement d'oligodendrogliomes de bas grade (grade II) alors que la deuxième voie, plutôt caractérisée par la présence des altérations génétiques isolées ou combinées telles que la perte du chromosome 10q, l'amplification de l'EGFR ou la délétion de p16/CDK4, donnerait plutôt lieu à des oligodendrogliomes infiltrants et plus agressifs (grade III).

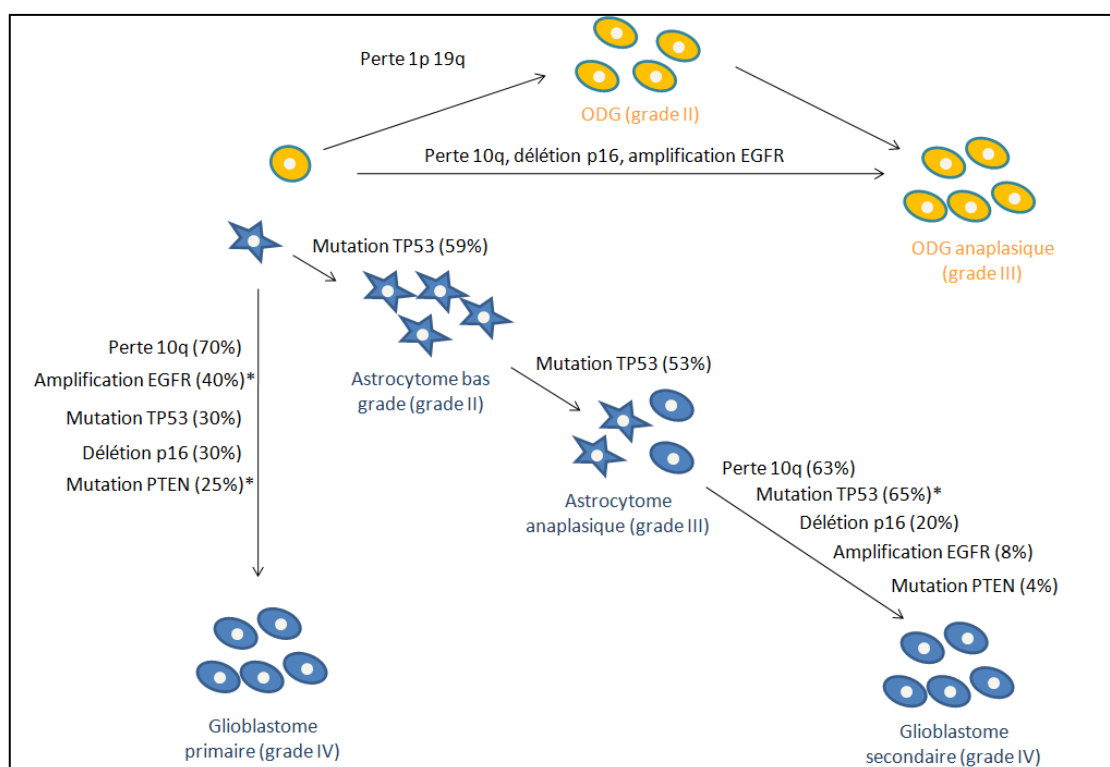


Figure 8 : Voies génétiques impliquées dans la tumorigenèse des oligodendrogliomes et glioblastomes primaires et secondaires (Selon Ohgaki *et al.*, 2004 et Hoang-Xuan, 2005). * altérations ayant des fréquences différentes entre GBM primaires et secondaires

c. Méningiomes

Plusieurs altérations génétiques ont été décrites dans le cas du méningiome, la plus commune étant la perte d'hétérozygotie du chromosome 22 (Dumanski *et al.*, 1990), retrouvée dans près de 75% des méningiomes.

D'autres altérations ont été observées telles que la perte d'hétérozygotie des chromosomes 1, 10 et 14. Il a été montré que les pertes alléliques des bras 1q, 10q et 14q sont plus fréquemment observées pour des méningiomes atypiques ou anaplasiques ; cela suggère que la présence de telles pertes dans des méningiomes bénins pourrait être une indication de récurrences potentielles (Simon *et al.*, 1995). Dans le cas du chromosome 10, la perte d'hétérozygotie est associée à une augmentation du grade des tumeurs et à une baisse de la survie des patients (Mihaila *et al.*, 2003).

Concernant les gènes impliqués dans la pathogénicité, une étude rapporte une inactivation biallélique du gène de la neurofibromatose NF2 (localisé sur le chromosome 22) codant pour une protéine, appelée schwannomine ou merline, dans plus de 70% des méningiomes de grade II et III et une mutation de ce gène dans une partie des méningiomes bénins. Cette protéine, membre de la famille des Ezrine, Radixine, Meosine ou ERM (famille 4.1), est cytoplasmique, sous-membranaire et est localisée au niveau des jonctions adhérentes entre les cellules (Bretscher *et al.*, 2002). Ces jonctions permettent la rigidité des tissus mais sont également nécessaires à l'inhibition de croissance par contact puisque ce contact permet aux cellules de stopper leur prolifération. Cette protéine a donc un rôle de régulation de la croissance cellulaire et son inactivation favoriserait le développement et la progression tumorale chez l'Homme et la souris (McClatchey *et al.*, 1998). Une autre étude a montré que des souris présentant une inactivation du gène NF2 dans les cellules arachnoïdiennes développeraient des méningiomes (Kalamarides *et al.*, 2002).

Une autre protéine, appelée DAL-1, dont le gène est localisé sur le chromosome 18, est impliquée dans la tumorigenèse de certains méningiomes puisqu'une perte d'expression de cette protéine a été observée dans environ 60% des méningiomes, de tous grades (Gutmann *et al.*, 2000). Cette protéine interagirait avec des protéines jouant un rôle dans la régulation de la croissance cellulaire.

Plusieurs protéines ont été décrites comme étant des protéines intervenant dans les mécanismes de l'adhérence et de l'invasivité. Parmi elles, on retrouve plusieurs protéines de

la matrice extracellulaire dont deux cathepsines, les métalloprotéases, SPARC (Secreted protein, acidic, cysteine-rich) et THBS1 (thrombospondin 1).

Les cathepsines B et L, protéases de la matrice extracellulaire, sont retrouvées avec des fréquences variables dans les méningiomes atypiques et sont présentes dans 53% des méningiomes ayant une invasivité osseuse (Strojnuk *et al.*, 2001). La métalloprotéase MMP9 également protéase de la matrice extracellulaire, est impliquée dans l'invasivité corticale des méningiomes ; le niveau d'expression des ARNm MMP9 augmentant avec le degré d'invasivité corticale. Par contre cette métalloprotéase n'aurait pas d'implication dans l'invasivité durale et osseuse (Kirches *et al.*, 2001).

La protéine SPARC serait un marqueur approprié de l'invasivité des méningiomes puisque une étude a montré que cette protéine n'était pas exprimée dans 9 méningiomes non invasifs mais l'était fortement dans 20 tumeurs invasives (Rempel *et al.*, 1999). Enfin, la thrombospondine 1 (THBS1) serait un marqueur plus spécifique de l'invasivité osseuse des méningiomes puisqu'il a été montré *in vitro* que cette protéine est fortement sécrétée par les cellules provenant de méningiomes avec une invasivité osseuse (Gay, 2004). Ces deux dernières protéines appartiennent à la famille des protéines dites « matricellular proteins » qui sont des modulateurs des interactions entre la cellule et la matrice extra-cellulaire, mécanismes qui contrôlent l'adhérence, la motilité et l'invasivité (Sage et Bornstein, 1991).

3. Traitement des tumeurs gliales et des méningiomes

a. La chirurgie

Le traitement de première intention est généralement la résection de la tumeur par les neurochirurgiens selon l'âge et l'état de santé du patient et si la localisation de la tumeur le permet pour éviter certains dommages neurologiques irréversibles. Une résection des gliomes de bas grade permet d'augmenter la durée de vie des patients alors que ce bénéfice dans le cas des tumeurs de grade plus élevé est moins évident (Vives et Piepmeyer, 1999). Cependant, la plupart des gliomes ayant un caractère invasif du parenchyme cérébral, l'exérèse totale peut s'avérer difficile, entraînant par la suite une récurrence même pour les gliomes de bas grade et ce, environ 11 mois après la chirurgie (Abeloos *et al.*, 2007).

Bien que préconisée comme traitement de choix des méningiomes (Longstreth *et al.*, 1993), elle peut également s'avérer insuffisante pour éviter la récurrence. En effet, une récurrence

est souvent observée, quelques années après l'exérèse, même dans le cas de méningiomes bénins en cas d'exérèse incomplète.

Il est donc nécessaire, dans de nombreux cas, de prévoir des thérapies adjuvantes associées à la chirurgie telles que la radiothérapie et/ou la chimiothérapie.

b. La radiothérapie

La radiothérapie consiste à irradier la tumeur aux rayons X. Les photons émis vont pouvoir alors ioniser les molécules d'eau et ainsi produire des radicaux libres. Ces radicaux libres peuvent ensuite se fixer sur l'ADN et induire des lésions dans les molécules d'ADN qui vont entraîner la mort des cellules. Le taux de réparation étant plus important dans les cellules saines que dans les cellules tumorales, l'effet de la radiothérapie reste ciblé aux cellules tumorales.

Pour les gliomes de bas grade, il a été montré que la radiothérapie n'apporte pas de bénéfice significatif pour la survie des patients (Van den Bent *et al.*, 2005) alors qu'une amélioration de 6 mois peut être apportée par cette thérapie dans le cas des gliomes de haut grade (Walker *et al.*, 1978 ; Laperriere *et al.*, 2002).

Dans le cas des méningiomes, la radiothérapie peut être utilisée selon le grade de la tumeur mais également selon la qualité de l'exérèse. En effet, une utilisation de la radiothérapie serait préconisée pour les méningiomes de grade II quelle que soit la qualité de l'exérèse et pour les méningiomes de grade I si l'exérèse se révèle incomplète, si une récurrence est observée après la première chirurgie ou si le méningiome est inopérable (Rogers *et al.*, 2007). De nombreuses études se sont intéressées à la comparaison du taux de survie à 5 ans entre des patients ayant subi une exérèse totale ou ayant subi une exérèse incomplète seule ou associée à la radiothérapie (pour revue Rogers *et al.*, 2001). L'une d'elle estime une augmentation de près de 50% de ce taux de survie entre des patients ayant subi une exérèse incomplète avec ou sans radiothérapie (Soyuer *et al.*, 2004). D'autres études se sont également intéressées, outre le taux de survie à 5 ans, au délai et au taux de rechute (pour revue Noel *et al.*, 2001). Par exemple, Barbaro et ses collègues ont montré il y a une vingtaine d'années, une diminution de 19% du taux de rechute (60% à 41%), une augmentation de 18% du taux de survie à 5 ans (59% à 77%) et de 59 mois du délai de rechute suite à une radiothérapie associée à une exérèse incomplète (Barbaro *et al.*, 1987).

c. La chimiothérapie

Les agents chimiothérapeutiques principalement utilisés sont les agents alkylants, tels que le temozolomide (Temodal[®]), le cisplatine ou les nitrosourées comme la carmustine BCNU (Gliadel[®]) et la lomustine CCNU. Les agents alkylants ont pour rôle de bloquer la réplication de l'ADN et donc d'empêcher les cellules à division rapide de se diviser. Le CCNU est souvent associé en thérapie à deux autres agents, la vincristine et la procarbazine (thérapie PCV) notamment pour le traitement des oligodendrogliomes anaplasiques. Le temozolomide, moins toxique que les autres agents chimiothérapeutiques (Friedman *et al.*, 2000), est un agent capable de franchir la barrière hémato-encéphalique (BHE) grâce à ses propriétés lipophiles. Ce traitement, associé à la radiothérapie, a permis d'augmenter de plus de 15% la survie à 2 ans pour des patients atteints de glioblastomes (Stupp *et al.*, 2005).

Certains agents utilisés pour le traitement des gliomes ont également été testés dans le cas des méningiomes comme la vincristine. En association à l'adriamycine et à la cyclophosphamide, ces trois agents sont considérés comme le régime le mieux documenté et le plus adapté pour le traitement par chimiothérapie des méningiomes malins (Chamberlain, 1996). Une autre molécule a été étudiée dans le cas des méningiomes récidivants, l'hydroxyurée. Bien que les études cliniques menées à l'heure actuelle sur cet agent sont modestes, il pourrait avoir cependant un rôle anti-tumoral prometteur car il entraîne l'apoptose des cellules de méningiomes (pour revue Newton, 2007).

d. Nouveaux essais de thérapie ciblée

Plusieurs études ont mis en évidence des voies moléculaires impliquées dans l'agressivité des gliomes et donc des cibles potentielles de thérapies plus ciblées. Par exemple, les études approfondies de la voie de signalisation des récepteurs aux tyrosines kinases (EGFR, PDGFR et VEGFR) ont permis de montrer que des inhibiteurs de ces récepteurs tels que le Gefitinib, l'Erlotinib, le Mésylate d'Inatimib ou le Bevacizumab (Avastin[®]) seraient de bons agents anti-tumoraux (Sathornsumetee et Rich, 2008). Ces récepteurs sont activés par l'action de médiateurs comme Akt, PI3K ou mTOR et des inhibiteurs de ces protéines ont fait l'objet d'essais cliniques comme la Perifosine ou le PI-103 (Momota *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2006). Deux autres agents, le Lomafarnib ou le Tipifarnib, sont également testés pour le traitement des glioblastomes. Ce sont des inhibiteurs

des farnésyltransférases, enzymes impliquées dans la localisation membranaire de Ras, autre médiateur de la voie de signalisation des récepteurs aux tyrosines kinases (Sathornsumetee et Rich, 2008).

Les méningiomes étant plus fréquemment retrouvés chez les femmes et étant souvent des tumeurs à récepteur progestérone-positif (70%) et œstrogène-positif (30%), il semblerait que la croissance de ces tumeurs soit hormone-dépendante. Des traitements hormonaux ont donc été envisagés pour le traitement de ces tumeurs, comme par exemple l'utilisation de mifepristone (RU-486), hormone stéroïde anti-progestative, ou de tamoxifen, antagoniste du récepteur à l'œstrogène (Grunberg *et al.*, 1991, Goodwin *et al.*, 1993). Pour le mifepristone, des tests longue-durée ont été menés sur des patients avec des méningiomes inopérables traités pendant environ 35 mois. Même si dans l'ensemble, les effets secondaires sont modérés, impliquant une faible fatigue, certains patients ont présenté des effets plus graves comme un adénocarcinome ou des hyperplasies de l'endomètre (Grunberg *et al.*, 2006) ; de tels effets avaient également été mis en évidence lors de tests cliniques précédents (de Keizer et Smit, 2004). Quant au tamoxifen, les essais cliniques de phase II menés au sein du SWOG (SouthWest Oncology Group) ont montré des résultats encourageants.

e. Nouvelles stratégies thérapeutiques

Outre la toxicité systémique engendrée par l'injection des traitements par voie-intraveineuse, une des principales difficultés pour le traitement des tumeurs cérébrales est la faible accessibilité au SNC due à la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE), séparant le sang du parenchyme cérébral. Une stratégie intéressante pour passer outre ces difficultés est la vectorisation des agents anticancéreux par des nano-objets répondant à un cahier des charges bien précis comme être biocompatibles, biodégradables, de taille nanométrique et faiblement immunogènes. Plusieurs vecteurs tels que les micelles, les liposomes, les nanoparticules polymériques ou lipidiques solides par exemple répondent à ce cahier des charges (Béduneau *et al.*, 2007). Cependant, un autre facteur important est le rendement d'encapsulation des agents anticancéreux, souvent faible avec l'utilisation de ces vecteurs mais amélioré avec le développement ces dernières années d'un système colloïdal, les nanocapsules lipidiques (Heurtault *et al.*, 2002). Ces capsules ont été montrées comme efficaces pour la vectorisation d'agents tels que l'etoposide ou le paclitaxel dans le cas des gliomes (Lamprecht et Benoit, 2006; Garcion *et al.*, 2006).

Partie II- Les microARN (miARN)

I- Généralités sur les miARN

1. Découverte des miARN

Cette classe d'ARN a été initialement découverte chez *Caenorhabditis elegans* au début des années 1990 par Victor Ambros et ses collègues (Lee *et al.*, 1993). Cette équipe découvrit le premier miARN, lin-4, petit ARN contenant des séquences complémentaires à des éléments répétés de la région 3'UTR des ARNm lin-14 et lin-28. Ils proposent alors une régulation de traduction de ces ARNm par lin-4 et ce, par interaction ARN/ARN antisens. Ce modèle de régulation a été validé la même année par Wightman et ses collègues qui démontrèrent, en utilisant des gènes rapporteurs, que la région 3'UTR de l'ARNm lin-14 est nécessaire et suffisante pour la régulation de sa traduction par lin-4 (Wightman *et al.*, 1993). Les protéines LIN-14 et LIN-28 étant des répresseurs de la transition du stade larvaire L1 vers le stade L2, la fixation du miARN lin-4 sur la région 3'UTR de ces ARNm permet donc cette transition par inhibition de la synthèse de LIN14 et LIN28.

La découverte d'un second microARN de 21 nucléotides, let-7, fut réalisée seulement au début des années 2000 également chez le nématode *C. elegans* (Reinhart *et al.*, 2000). Le gène let-7, tout comme lin-4, appartient à la famille des gènes hétérochroniques contrôlant la coordination temporelle du développement larvaire de *C. elegans*. Dans ce cas, cet ARN court intervient plutôt dans la transition du stade larvaire L3/L4 vers le stade adulte en réprimant l'expression de lin-41 également par interaction avec la région 3'UTR de l'ARNm (Figure 9).

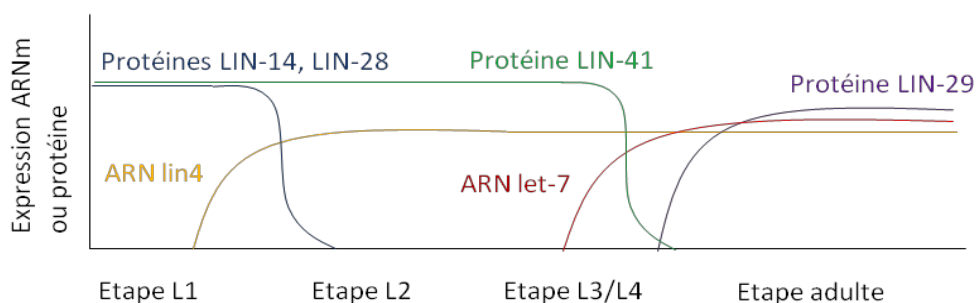


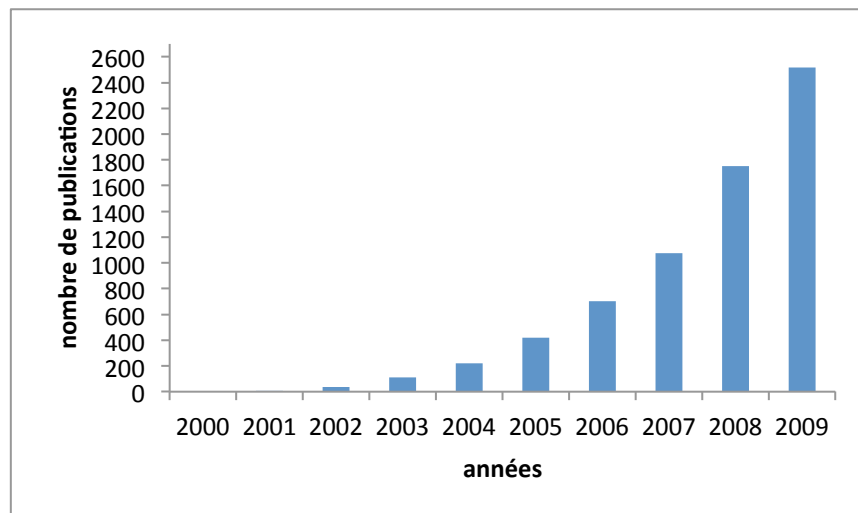
Figure 9 : Modèle de régulation du développement larvaire de *C. elegans* par lin-4 et let-7 (selon Reinhart *et al.*, 2000).

Figure 10 : Nombre de publications sur les miARN ces neuf dernières années *Introduction*
(données PubMed).

1751

Ces deux ARN courts furent tout d'abord nommés « small temporal RNAs » (stRNAs) (Pasquinelli *et al.*, 2000) dû à leur rôle dans le contrôle du développement et renommés miARN en 2001 (Lagos-Quintana *et al.*, 2001).

Au cours des années 2000, la recherche sur les miARN a été grandissante comme le montre le nombre de publications scientifiques entre 2000 et 2009 sur les microARN (Figure 10).



Plusieurs ARN de ce type ont par la suite été décrits dans d'autres organismes que le nématode, tels que la mouche *D. melanogaster*, la souris, les plantes ou dans des lignées cellulaires humaines (Lagos-Quintana *et al.*, 2002 ; Reinhart *et al.*, 2002 ; Aravin *et al.*, 2003 ; Dostie *et al.*, 2003 ; Houbaviy *et al.*, 2003 ; Lagos-Quintana *et al.*, 2003 ; Lim *et al.*, 2003).

Les miARN sont détectés soit par l'utilisation du séquençage après clonage soit par approche informatique par des logiciels de prédiction basés sur la conservation des miARN au sein des espèces et sur la détection de structures en « tige-boucles » caractéristiques des précurseurs des miARN. Il existe une base de données, miRBase <http://microrna.sanger.ac.uk/> (Griffiths-Jones *et al.*, 2008) créée pour recenser les miARN nommés dans les publications scientifiques et mis en évidence par des techniques de clonage/séquençage principalement. Cette base de données recense actuellement 1223 miARN chez l'Homme dans sa version 16 (Septembre 2010).

2. Nomenclature des miARN

Une nomenclature a été mise au point selon plusieurs critères (Griffiths-Jones *et al.*, 2006). Pour bien comprendre les différents aspects de cette nomenclature, il est nécessaire de présenter rapidement la maturation des miARN (Figure 11), mécanisme présenté plus en détail dans la partie II - Biogenèse des miARN.

Les gènes sont tout d'abord transcrits sous forme de pri-miARN, transcrits primaires en structure de tige-boucle, excisés par la suite par la RNase III Drosha associée à la protéine DGCR8 libérant ainsi un précurseur appelé pré-miARN. Un deuxième procédé, minoritaire, permet la formation d'un pré-miARN appelé « mirtron » après épissage d'un intron. Ces molécules précurseurs sont ensuite exportées du noyau vers le cytoplasme grâce à l'exportine-5 et maturés ensuite par la RNase III Dicer libérant un duplex miARN-miARN*. Seul l'un des 2 brins est ensuite incorporé dans le complexe RISC, complexe comprenant principalement les protéines de type Argonaute ; le brin incorporé étant considéré comme le brin mature.

Les miARN matures sont notés « miR », contrairement à leurs précurseurs ou aux gènes codant les miARN, notés quant à eux, « mir ». L'organisme d'origine est indiqué par 3 lettres en préfixe comme par exemple hsa pour homo sapiens ou mmu pour mus musculus. Lorsqu'un pré-miARN donne lieu à deux miARN matures, on retrouve comme indication, après le suffixe chiffré indiquant le numéro du miARN, quel brin du pré-miARN donne lieu au miARN. Pour cela, la nomenclature est la suivante :

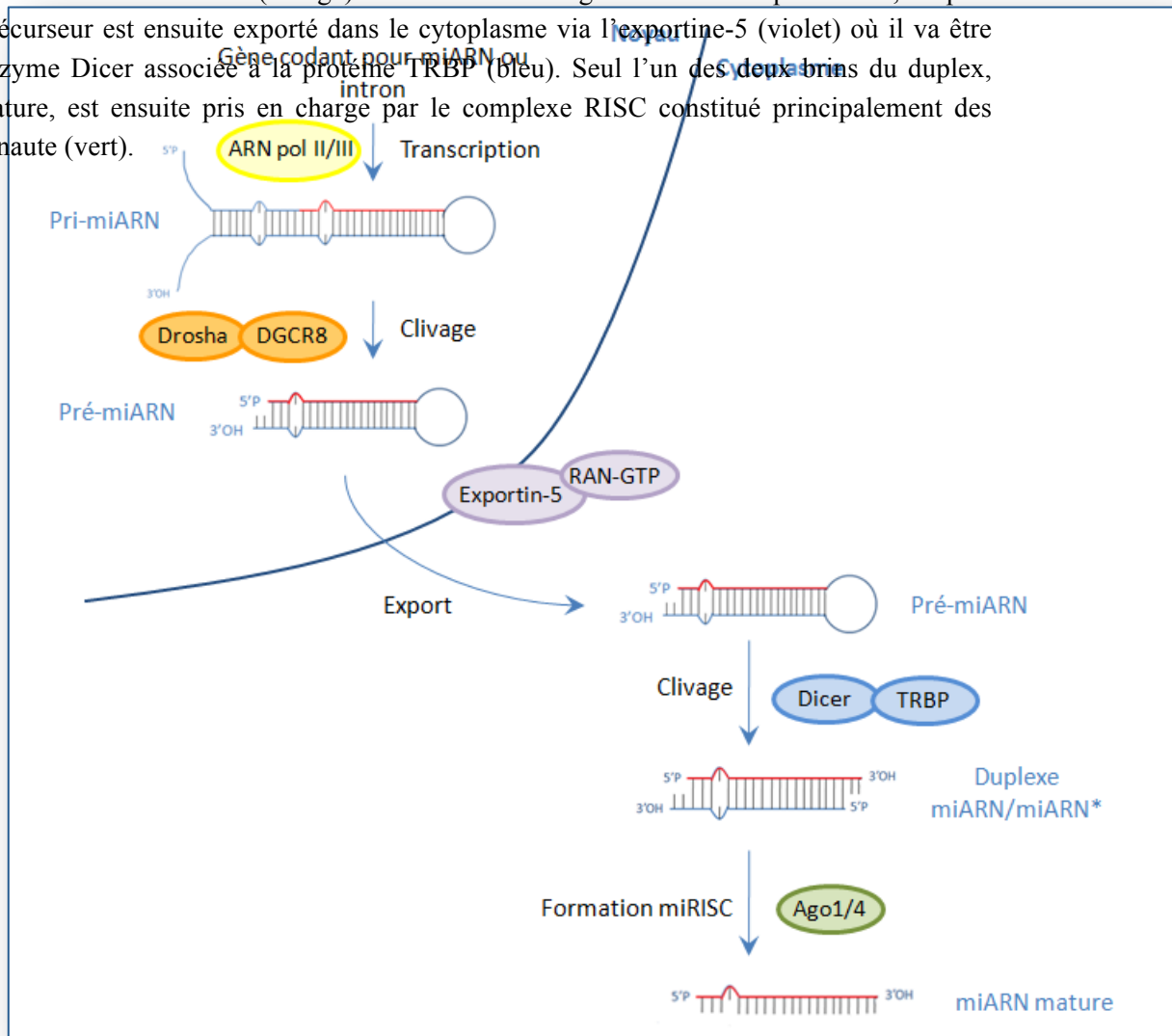
- miR-X et miR-X* avec miR-X* étant le miARN mature le moins abondant des deux brins
- miR-X-5p et miR-X-3p avec 5p représentant le brin 5' de la tige-boucle du pré-miARN et 3p le brin 3'
- miR-X-s (bras 5') et miR-X-as (bras 3')

La nomenclature miR-X-5p ou miR-X-3p est généralement favorisée jusqu'à ce que les données concernant l'abondance des deux brins soit suffisantes pour utiliser la nomenclature miR-X et miR-X* (Griffiths-Jones, 2004).

Figure 11 : Mécanisme de biogenèse des microARN.

Introduction

La transcription par une polymérase (symbole jaune) d'un gène codant pour un miARN ou l'épissage d'un intron génère un transcrit primaire noté pri-miARN. La prise en charge de ce transcrit par la RNase Drosha associée à DGCR8 (orange) entraîne son clivage en un ARN précurseur, le pré-miARN. Ce précurseur est ensuite exporté dans le cytoplasme via l'exportine-5 (violet) où il va être excisé par l'enzyme Dicer associée à la protéine TRBP (bleu). Seul l'un des deux brins du duplex, appelé brin mature, est ensuite pris en charge par le complexe RISC constitué principalement des protéines Argonaute (vert).



Il existe certaines familles de miARN matures qui se différencient par quelques bases seulement. Cette différence est indiquée par une lettre en suffixe, comme par exemple miR-181a et miR-181b :

miR-181a : AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU

miR-181b : AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU

De plus, lorsqu'un miARN mature est le résultat de maturation de régions chromosomiques différentes, une distinction est faite par un deuxième suffixe chiffré. C'est par exemple le cas pour miR-181a-1 et miR-181a-2, indiquant que miR-181a provient de 2 loci différents (chromosome 1 pour miR-181a-1 et chromosome 9 pour miR-181a-2).

Il existe cependant quelques miARN ne répondant pas à cette nomenclature comme par exemple hsa-let-7 ou cel-lin-4.

3. Comparaison avec les autres acteurs de l'ARN interférence

Le processus d'ARN interférence (ARNi) est impliqué principalement dans la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de gènes et est conservé au cours de l'évolution au sein d'espèces variées appartenant à différents règnes (champignons, plantes et animaux). Ce mécanisme fondamental a valu à Andrew Fire et Craig Mello le prix Nobel de Médecine et de Physiologie en 2006 (Fire, 1998 ; Mello, 2004). Deux classes d'ARN courts interviennent principalement dans ce processus, les miARN et siARN (short interfering RNA). Ces ARN partagent quelques similitudes comme leur courte taille d'une vingtaine de nucléotides, leur maturation par la ribonucléase Dicer et leur implication dans le complexe RISC pour l'induction de la répression post-transcriptionnelle.

Cependant quelques différences existent, les principales étant les suivantes :

- Les miARN sont exclusivement endogènes puisqu'ils dérivent de gènes propres à l'organisme dans lequel ils interviennent alors que les siARN peuvent provenir de virus, d'éléments transposables, d'ARN double brin parfaitement appariés endogènes résultant d'une transcription antisens de certains loci (Watanabe, 2008) ou exogènes par injection expérimentale.

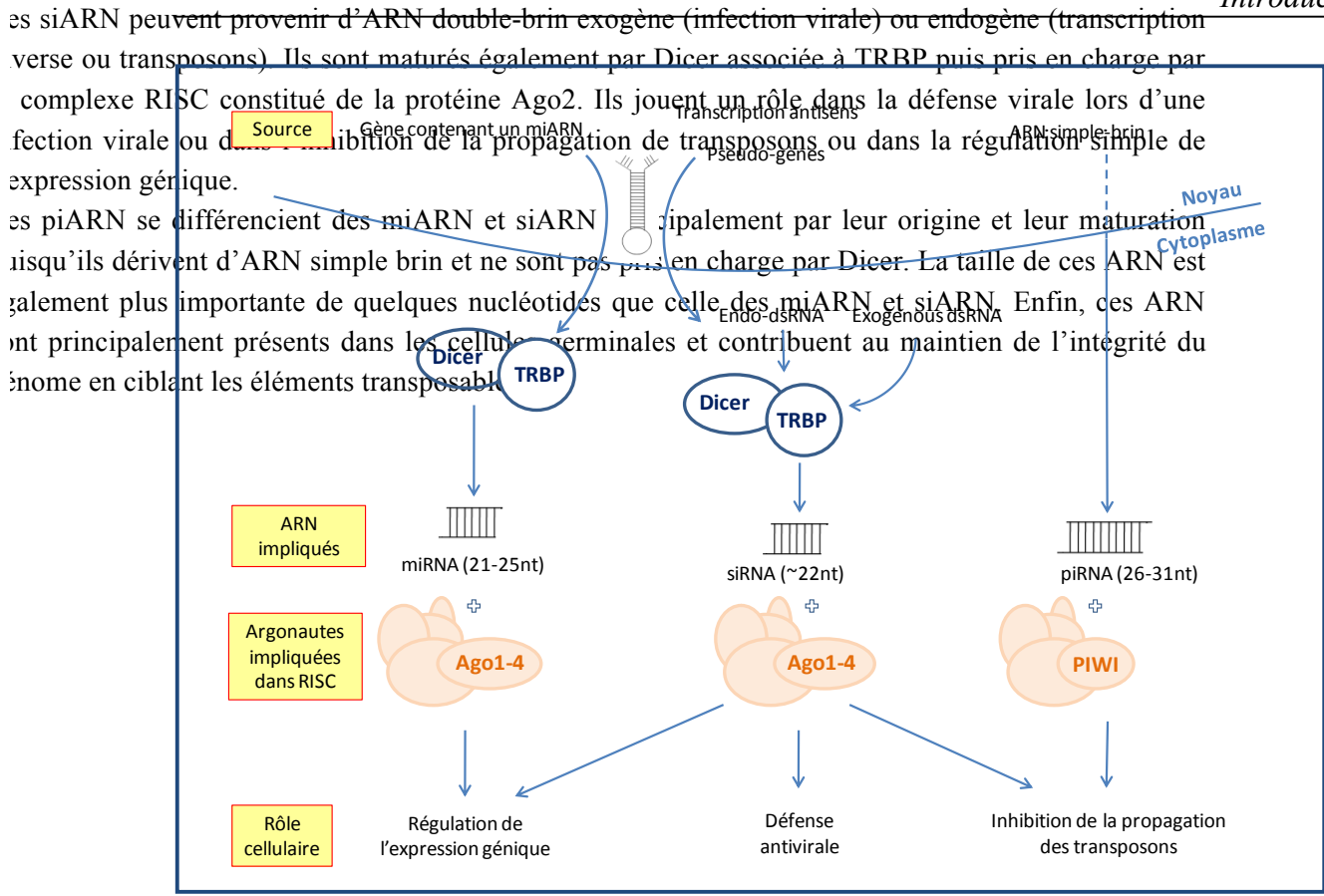
- Les miARN jouent un rôle dans la régulation de gènes autres que ceux qui les produisent alors que les siARN régulent principalement les gènes desquels ils dérivent dans l'objectif

d'assurer la défense des cellules hôtes contre les ARN parasites, comme les virus ou les transposons par exemple.

- Les miARN ont un degré d'appariement avec leur cible pouvant varier chez les mammifères alors que les siARN s'hybrident toujours parfaitement avec leur cible. Lorsque la complémentarité entre miARN et ARNm est parfaite, on observe la dégradation de l'ARNm, dégradation possible en présence de la protéine Ago2 qui est la seule protéine des 4 de la famille Argonaute étant responsable du clivage endonucléolytique. Il n'y a que chez les plantes que la différence entre miARN et siARN est faible compte tenu du fait que l'appariement entre le miARN et son ARNm cible est souvent parfaite (Bartel, 2004).

Outre les miARN et siARN, acteurs principaux de l'ARN interférence, il existe d'autres petits ARN, les piARN (piwi-interacting ARN) plus longs (26-31 nucléotides) et exprimés seulement dans les lignées germinales (figure 12). Ces ARN, autrefois appelés « repeat-associated siARN » (rasiARN), ont été découverts par Aravin et ses collègues chez *D. melanogaster* (Aravin *et al.*, 2001). En 2006, plusieurs études ont montré la présence de piARN chez les mammifères (Aravin *et al.*, 2006 ; Girard *et al.*, 2006 ; Grivna *et al.*, 2006 ; Watanabe *et al.*, 2006). Concernant leur biogenèse, contrairement aux siARN et miARN, il semblerait qu'ils dérivent de longs précurseurs d'ARN simple brin et ne soient pas maturés grâce aux protéines Dicer. La plupart de ces ARN sont des transcrits antisens mais une petite fraction est transcrite en orientation sens. Une fois maturés, les piARN s'associent aux protéines PIWI, protéines de la famille des Argonautes, pour cibler principalement les transposons et ainsi préserver l'intégrité du génome (Malone *et al.*, 2009).

Figure 12 : Comparaison entre les miARN, les siARN et les piARN.



II- Biogenèse des miARN

1. Localisation et structure des gènes codant les miARN

L'identification des gènes codant les miARN chez l'Homme peut être effectuée par homologie avec le génome d'autres espèces, par recherche bioinformatique et enfin par validation par exemple en utilisant des méthodes de northern blot, PCR, hybridation sur puce ou séquençage.

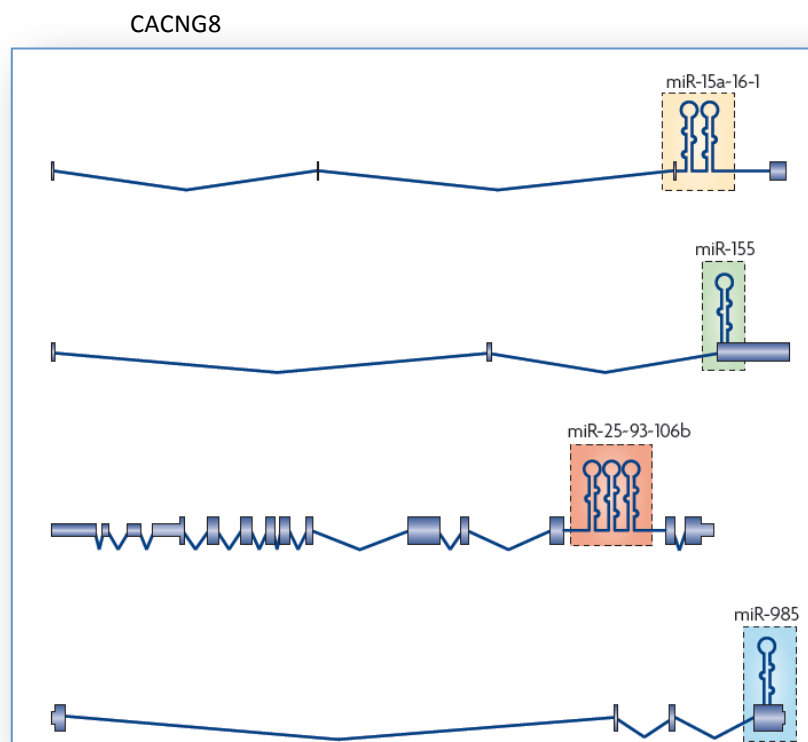
Figure 13 : Localisation des gènes codant les miARN situés dans des unités géniques codant des pré-ARNm (selon Kim *et al.*, 2009).

Les miARN peuvent être localisés dans des unités de transcription ne codant pas (A) ou codant (B) des protéines. Dans ces deux cas, les miARN peuvent être introniques (1) ou exoniques (2). Ces gènes sont dispersés sur l'ensemble des chromosomes excepté le chromosome Y

et environ 50% des miARN décrits sont regroupés en « cluster ». On peut alors parler de miARN polycistroniques lorsqu'ils sont sous la dépendance d'un même promoteur.

Les gènes codant les miARN peuvent être, soit dans des unités géniques indépendantes et les miARN sont alors dits « intergéniques », soit dans des unités géniques codant pour des pré-ARNm pouvant coder ou non pour des protéines. Dans ce cas, les miARN peuvent être introniques ou exoniques (Figure 13) (Rodriguez *et al.*, 2004 ; Saini *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2009).

2



2. Transcription des transcrits primaires

La plupart des gènes codant les miARN sont transcrits par l'ARN polymérase II produisant des transcrits primaires (les pri-miARN) de plusieurs centaines à plusieurs milliers de nucléotides. Ces transcrits primaires ont une structure typique composée d'une tige d'environ 33 paires de base, une boucle terminale reliant les 2 brins de la tige ainsi que des séquences « flanquantes » simple-brin. Ces séquences possèdent, comme les ARNm, une coiffe caractérisée par la structure 7-méthyl-guanosine (m7G) à l'extrémité 5' et une queue poly-A à l'extrémité 3' (Cai *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2004).

La transcription étant effectuée par l'ARN polymérase II, la régulation de ce mécanisme pourrait être similaire à la régulation de la transcription des gènes codant pour des protéines. Quelques études se sont intéressées à la localisation *in silico* des régions promotrices des gènes codant les miARN principalement par localisation des sites de début de transcription (TSS) ainsi que par la recherche de séquences de liaison des facteurs de transcription, et ce chez *A. thaliana*, *C. elegans* et *H. sapiens* (Megraw *et al.*, 2006, Saini *et al.*, 2007, Zhou *et al.*, 2007). Deux études ont ensuite mis en évidence, par des techniques génomiques à haut débit telles que l'immunoprécipitation de la chromatine, la localisation et les caractéristiques de séquences des TSS des miARN humains (Marson *et al.*, 2008 ; Oszolak *et al.*, 2008).

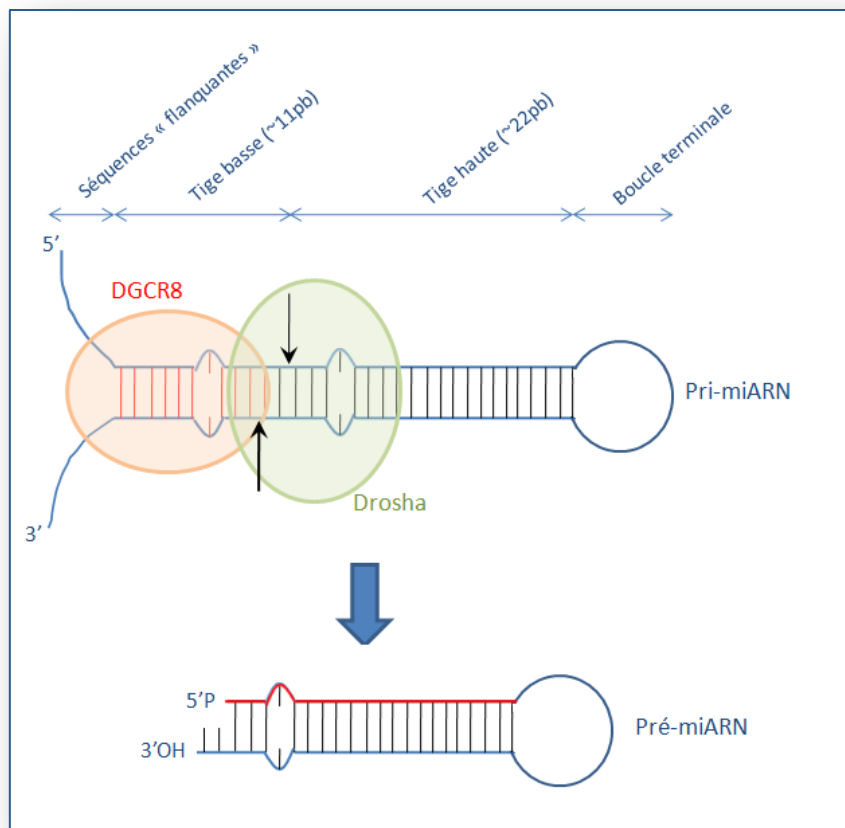
3. Maturation des transcrits primaires en miARN

a. Formation du pré-miARN dans le noyau

Chez l'Homme, les transcrits primaires sont pris en charge dans le noyau, par un complexe protéique, appelé « microprocesseur » et composé de Drosha associée à son cofacteur DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region gene 8) (Gregory *et al.*, 2004). La protéine DGCR8, qui est une protéine de liaison à l'ARN double brin, est nécessaire pour la fixation du complexe Drosha-DGCR8 au pri-miARN au niveau de la jonction entre les séquences « flanquantes » simple-brin et la tige. Une fois le complexe fixé sur le pri-miARN, DGCR8 va permettre de définir la distance de clivage par Drosha à partir de cette jonction (~11pb). L'enzyme Drosha est une ribonucléase de type III de 2ème classe, ie possédant deux

Figure 14 : Maturation du pri-miARN en pré-miARN par le complexe Drosha/DGCR8 (Selon Han *et al.*, 2006).

DGCR8, protéine de liaison à l'ARN double-brin, reconnaît les séquences « flanquantes » du transcrit primaire et permet le clivage par Drosha de la tige-boucle, à environ 11 pb de la jonction libérant la tige-boucle du pri-miARN après clivage asymétrique (Lévesque *et al.*, 2003). La tige-boucle obtenue alors, nommée pré-miARN, possède deux nucléotides non appariés à l'extrémité 3' et un phosphate à l'extrémité 5' (Han *et al.*, 2006) (Figure 14) ; une telle asymétrie étant spécifique des RNases de type III.

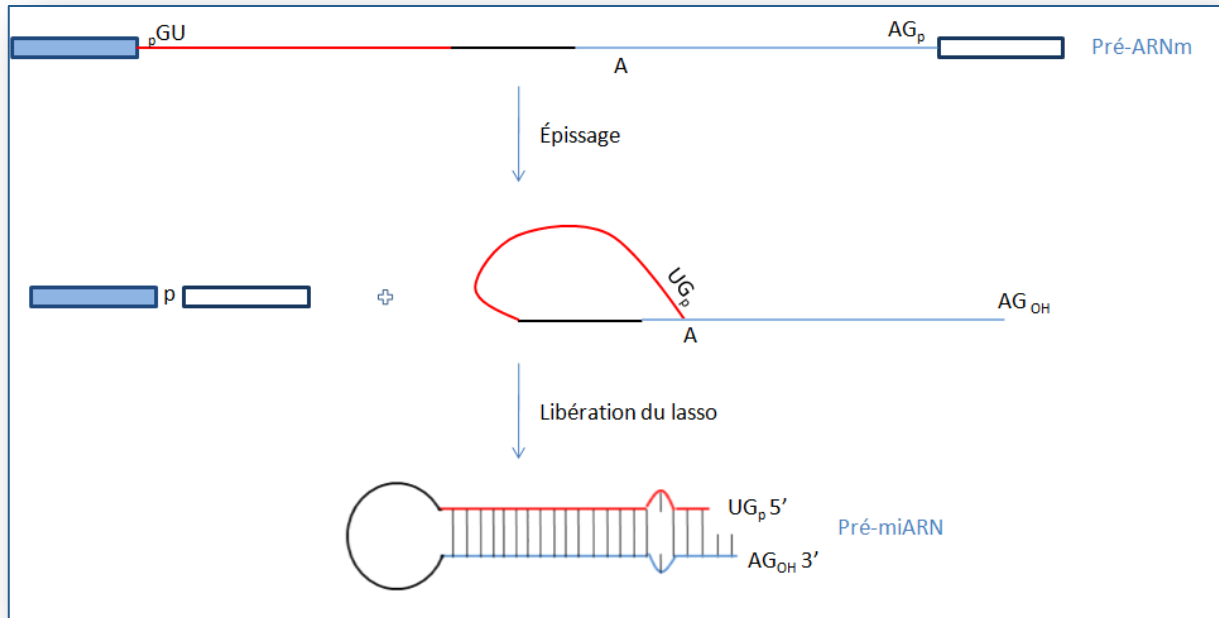


Une autre voie de génération des pré-miARN est la voie dite « des mirtrons ». Cette voie permet la synthèse d'un pré-miARN par la machinerie d'épissage puisque l'intron libéré après épissage et libération du lasso se structure en forme de tige-boucle. Dans ce cas, les extrémités 5' et 3' correspondent respectivement aux sites d'épissage donneurs (AG) et accepteurs (GU). Au préalable décrite chez les invertébrés *D. melanogaster* et *C. elegans*

Figure 15 : Voie des « mirtrons ».

L'intron, après épissage et libération du lasso, se structure en tige-boucle pour former le pré-miARN (ou pré-mirtron). Les extrémités 5' et 3' correspondent respectivement aux sites d'épissage donneur GU et accepteur AG.

(Okamura *et al.*, 2007; Ruby *et al.*, 2007), la voie des mirtrons a également été mise en évidence chez les mammifères (Berezikov *et al.*, 2007). La principale différence est la localisation du miARN mature, plutôt présente sur le bras 3' de la tige-boucle chez les invertébrés et sur le bras 5' chez les mammifères (Figure 15).



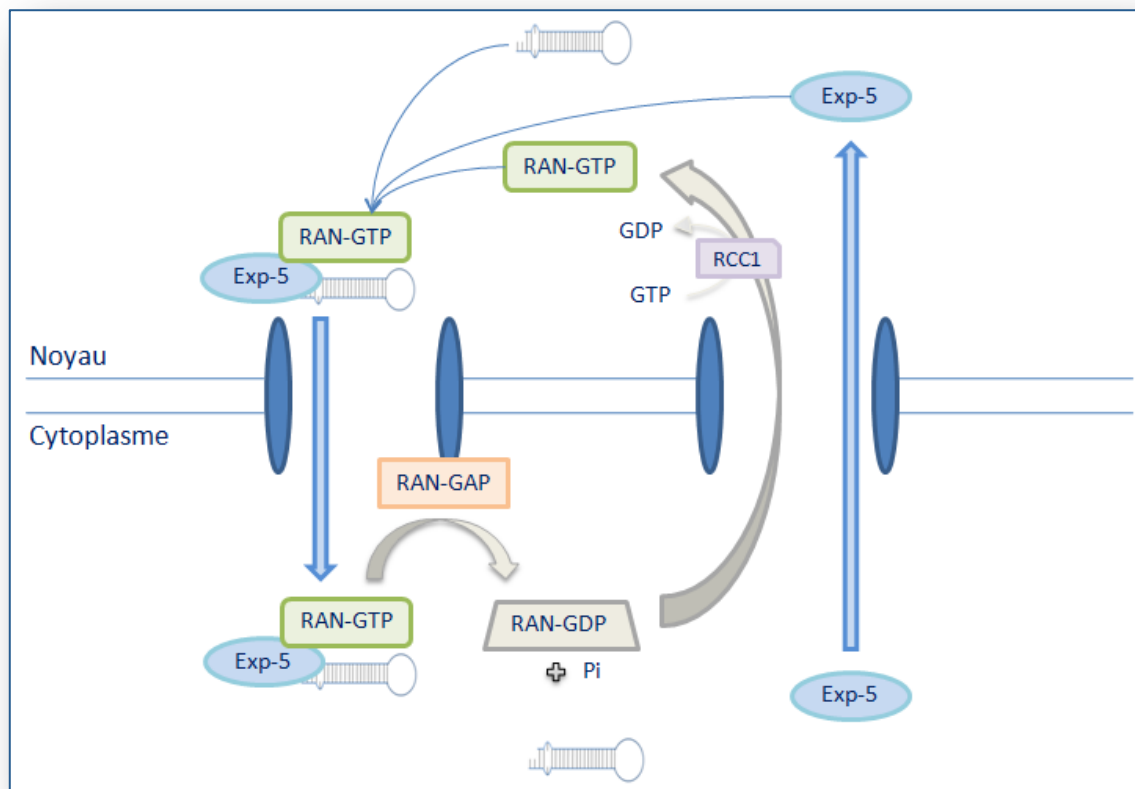
b. Export du pré-miARN du noyau vers le cytoplasme

Les pré-miARN sont ensuite exportés dans le cytoplasme pour y subir une autre étape de maturation. L'export des ARN (messagers, ribosomiques, de transfert) est principalement possible par action de certains récepteurs de la famille des karyophérines, à savoir CRM1 et l'exportine t (Exp-t). Cependant, pour l'export des pré-miARN du noyau vers le cytoplasme, un autre récepteur de cette même famille est préférentiellement utilisé, l'exportine-5 (Exp-5) (Lund *et al.*, 2004). Ce récepteur, découvert en 2002, appartient à la famille des karyophérines β . Comme tout récepteur de cette famille, il se lie directement et spécifiquement au cofacteur RAN-GTP dans le noyau, puis se fixe aux nucléoporines pour permettre le passage du pré-miARN du noyau au cytoplasme (Brownawell et Macara, 2002). Exp-5 est spécifique des ARN double brin de taille supérieure à 14pb et possédant une extrémité 3' protubérante non

Figure 16 : Mécanisme d'export du pré-miARN du noyau vers le cytoplasme

(Selon Yi *et al.*, 2005).

Le complexe Exp-5/RAN-GTP/pré-miARN se lie aux nucléoporines dans le noyau, une fois appariée de quelques nucléotides (Gwizdek *et al.*, 2004), d'où sa spécificité de liaison au pré-miARN et passe à travers les pores nucléaires. La libération du pré-miARN dans le cytoplasme est possible après hydrolyse du RAN-GTP par la RAN-GTPase activating protein. Le pré-miARN est ensuite retransporté dans le noyau et RAN-GTP est régénéré par l'action de RCC1. Une enzyme, la RAN-GAP (RAN-GTPase activating protein) localisée sur la face cytoplasmique des pores, active ensuite l'hydrolyse de RAN-GTP en RAN-GDP (Kehlenbach *et al.*, 1999) entraînant la libération du pré-miARN dans le cytoplasme (Figure 16).



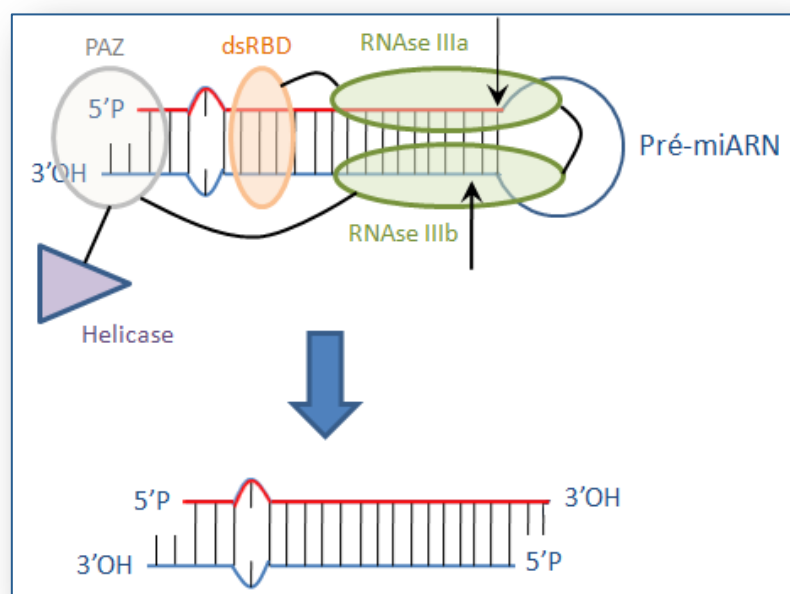
c. Production du miARN mature dans le cytoplasme

Lorsque le pré-miARN est dissocié du complexe permettant son transport, il est pris en charge dans le cytoplasme par l'enzyme Dicer qui va permettre de terminer sa maturation. Décrite précédemment pour la maturation des siARN (Bernstein *et al.*, 2001), elle a ensuite

Figure 17 : Clivage du pré-miARN par Dicer (Selon Zhang *et al.*, 2004).

Le domaine PAZ de Dicer permet la reconnaissance des deux nucléotides non appariés en 3'. Une fois cette reconnaissance effectuée, le domaine de liaison à l'ARN double brin (dsRBD) permet le positionnement des domaines RNase III à environ 21 nucléotides de la base de la tige-boucle. Le clivage par Dicer permet d'obtenir également une asymétrie aux extrémités avec deux nucléotides non appariés en 3' du côté de la boucle tronquée.

Dicer donne lieu à des miARN de 21 nucléotides (Hutvagner *et al.*, 2001, Ketting *et al.*, 2001). Dicer est également une ribonucléase de type III, de 3ème classe cette fois puisqu'elle est constituée de deux domaines RNase III et d'un motif de liaison à l'ARN double-brin mais également d'un domaine PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) et d'un motif hélicase. Le domaine PAZ permet à Dicer de reconnaître les éléments spécifiques des extrémités du pré-miARN, à savoir principalement les deux nucléotides non appariés en 3' (Song *et al.*, 2003 ; Ma *et al.*, 2004). Quant au motif de liaison à l'ARN double-brin, il permet, une fois cette reconnaissance effectuée, la fixation de Dicer à la tige (Zhang *et al.*, 2002 ; Zhang *et al.*, 2004). Cette fixation entraîne un positionnement des domaines RNase III à environ 21bp de la base de la tige et donc un clivage endonucléolytique à ce niveau. Cette étape de maturation est donc complémentaire de l'étape réalisée par Drosha pour la définition des deux extrémités du miARN mature (Figure 17).



III- Mécanismes de régulation de l'expression génique par les miARN

1. Prise en charge du miARN par le Risc loading complex (RLC) et formation du complexe miRISC

Lors de l'étape de maturation effectuée par Dicer, deux autres protéines, TRBP et Ago2, ont été identifiées comme nécessaires pour former le complexe RLC avec Dicer (Chendrimada *et al.*, 2005 ; Gregory *et al.*, 2005 ; Maniataki et Mourelatos, 2005 ; MacRae *et al.*, 2008). La plupart des études de ce complexe ont été effectuées *in vivo* à partir d'extraits cellulaires ; seuls MacRae et ses collègues se sont intéressés au complexe reconstitué *in vitro* par association de ces trois protéines recombinantes. Dans ce cas, ces trois protéines sont suffisantes pour réaliser les étapes de maturation du pré-miARN (reconnaissance et clivage par Dicer) ainsi que la sélection d'un des deux brins dans le complexe miRISC. Ces trois protéines semblent être, dans ce cas, présentes en quantités stoechiométriques et la protéine TRBP étant dimérique (Cosentino *et al.*, 1995), sa dissociation est nécessaire pour la formation du complexe RLC. Chez la drosophile, l'assemblage de ce complexe Dicer/TRBP/Ago nécessite un apport d'énergie sous forme d'ATP (Kawamata *et al.*, 2009) alors que chez l'Homme, plusieurs études contradictoires font état, soit d'un mécanisme d'assemblage ATP-indépendant (Gregory *et al.*, 2005 ; Maniataki et Mourelatos, 2005 ; MacRae *et al.*, 2008), soit ATP-dépendant (Yoda *et al.*, 2010).

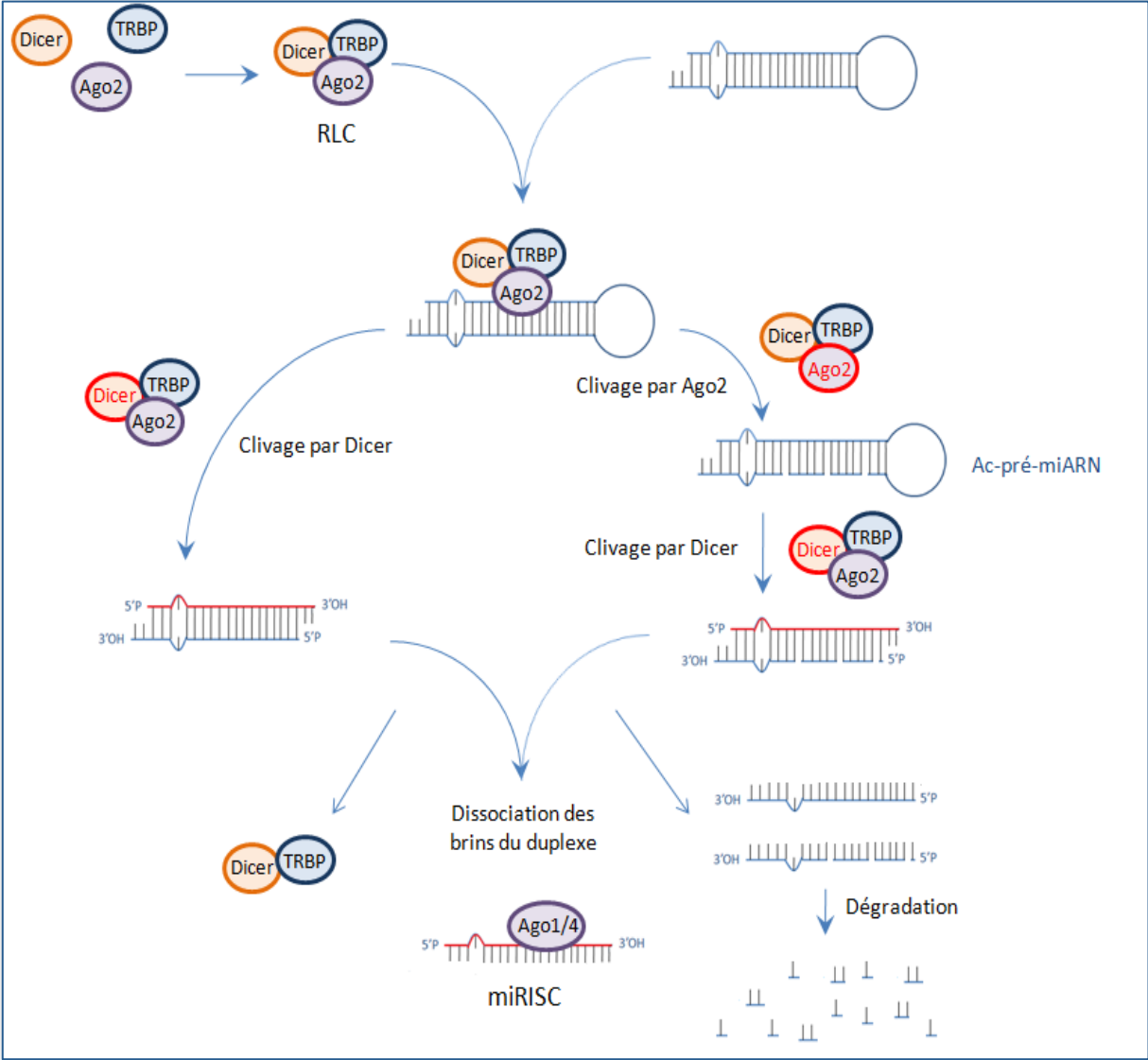
Le duplexe d'ARN obtenu après maturation possède deux nucléotides non appariés aux extrémités 3', caractéristique de l'action des deux RNAses de type III, Drosha et Dicer. Même si dans certains cas, les deux brins du duplex peuvent s'accumuler dans la cellule (Lagos-Quintana *et al.*, 2001 ; Mourelatos *et al.*, 2002) et être considérés comme brins matures permettant de guider le complexe miRISC vers les ARNm cibles (Okamura *et al.*, 2008), la plupart du temps seul un des deux brins est privilégié et la sélection est considérée comme asymétrique (Schwarz *et al.*, 2003 ; Khvorova *et al.*, 2003). Le brin non sélectionné est nommé brin « passager » et annoté miR-X* (cf nomenclature Partie II- I- 2). Quant au brin sélectionné, nommé brin « guide » ou mature et annoté miR-X, il correspond au brin ayant l'extrémité 5' la moins stable thermodynamiquement ; c'est-à-dire ayant l'énergie de liaison la plus faible sur environ 4pb (Khvorova *et al.*, 2003). Cette instabilité thermodynamique pourrait alors faciliter le déroulement des deux brins par une hélicase, comme par exemple Gemin3 (Mourelatos *et al.*, 2002) ou RHA, décrite plus récemment (Robb et Rana, 2007),

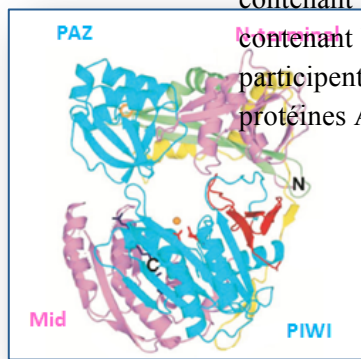
hélicases de la famille DEAD-box. Une autre alternative serait l'utilisation du motif hélicase de Dicer, idée cohérente avec le fait que le RLC décrit par MacRae et ses collègues *in vitro* (Dicer/TRBP/Ago2) soit suffisant pour la sélection du miARN mature. Dans le cas d'une activité de dissociation par une hélicase, l'ATP ne semble pas être absolument nécessaire ; l'énergie libérée après clivage par Dicer des deux liaisons phosphodiester pourrait suffire pour effectuer cette dissociation (MacRae *et al.*, 2008). Une autre étude récente suggère que ce sont les protéines Argonaute Ago1 et Ago2 qui permettraient la séparation des deux brins du duplexe de par leur rôle de protéines « chaperonnes » (Wang *et al.*, 2009). Quant au devenir du brin passager après dissociation des deux brins, certaines études font état de sa dégradation par clivage dans le cas des duplexes siARN par les protéines Argonaute (Rand *et al.*, 2005 ; Leuschner *et al.*, 2006). Concernant les duplexes miARN, la question du devenir du brin passager reste peu claire. Selon Matranga et ses collègues cette dégradation par clivage n'a pas lieu du fait de la complémentarité imparfaite entre les deux brins (Matranga *et al.*, 2005). Cependant, une autre étude a mis en évidence quelques exemples de duplexes miARN pour lesquels il pourrait y avoir dégradation du brin passager du fait d'une forte complémentarité au centre de ce duplexe (Shin, 2008). Selon Diederichs et Haber, il pourrait y avoir une voie parallèle à la voie normale d'obtention du duplexe après action de Dicer, séparation des deux brins et dégradation du brin passager, qui serait une voie au cours de laquelle, Ago2 cliverait le brin passager avant même l'action de Dicer (Diederichs et Haber, 2007). Le complexe RLC permet *in fine* le chargement du miARN mature, après dissociation des brins, dans le complexe miRISC. Parmi les trois protéines composant le RLC, à savoir Dicer, TRBP et Ago, seule cette dernière appartient au cœur minimum du complexe miRISC (Figure 18).

Les protéines Argonaute sont constituées de 2 lobes ; un lobe contenant le domaine N-terminal et le domaine PAZ, l'autre lobe contenant les domaines Mid et PIWI (Figure 19) (Yuan *et al.*, 2005). Bien que les fonctions de ces domaines ne soient pas toutes bien définies, il semblerait que les trois domaines PAZ, Mid et PIWI jouent un rôle important dans le phénomène d'ARN interférence puisqu'ils sont essentiels à l'interaction avec le miARN (Parker *et al.*, 2005). En effet, le domaine PAZ, identique à celui retrouvé chez Dicer, se lie aux duplexes possédant deux nucléotides non appariés à l'extrémité 3' mais également aux ARN simple-brin et reconnaît donc l'extrémité 3' du miARN mature (Song *et al.*, 2003 ; Ma *et al.*, 2004 ; Lingel *et al.*, 2004). Le domaine Mid permettrait la reconnaissance de l'extrémité 5' phosphate du miARN mature ainsi que la coiffe m7G de l'ARNm (Boland *et*

Figure 18 : Formation du complexe miRISC (Selon Diederichs et Haber, 2007). Introduction

Le complexe RLC est composé de Dicer, TRBP et Ago2. Deux voies seraient possibles avant incorporation du miARN mature dans le complexe miRISC. La première, souvent décrite, permettrait la dissociation des deux brins du duplexe après clivage du pré-miARN par Dicer. La seconde voie pourrait intervenir un premier clivage du brin complémentaire par Ago2, et permettrait d'obtenir un pré-miARN appartenant à la famille des RNAses II et permettrait d'assurer au complexe RISC une activité transitoire, nommé Ac-pré-miARN (Ago2-clived pré-miARN), avant son clivage par Dicer. Dans ce modèle, les brins « passagers » seraient ensuite dégradés.





Ces protéines sont constituées de deux lobes, l'un contenant les domaines PAZ et N-terminal et l'autre contenant les domaines PIWI et Mid. Ces deux domaines participent, avec le domaine PAZ, à l'interaction des protéines Ago avec le miARN.

Il existe chez l'Homme quatre protéines Argonaute (Ago1-4). Contrairement à la drosophile où seule Ago1 est spécialisée pour la prise en charge des miARN (Ago2 étant spécialisée pour la prise en charge des siARN) (Okamura *et al.*, 2004), il semblerait que chez l'Homme, les quatre protéines Argonaute puissent prendre en charge les miARN mais seule Ago2 possède l'activité endonucléolytique (Liu *et al.*, 2004 ; Meister *et al.*, 2004).

2. Interaction miARN/ARNm et sites cibles

a. Mécanismes d'interaction entre le miARN et l'ARNm cible

L'interaction entre les microARN et les ARN messagers s'effectue au niveau de leur extrémité 3'UTR par complémentarité de base. Chez les plantes, nombreux sont les miARN présentant des complémentarités parfaites avec leurs ARNm cibles entraînant la dégradation de cet ARN par clivage endonucléolytique au milieu du duplexe miARN-ARNm cible (Rhoades *et al.*, 2002 ; Jones-Rhoades *et al.*, 2006). Chez les métazoaires, au contraire, la complémentarité entre le miARN et son ARNm cible est la plupart du temps imparfaite et lorsqu'elle est parfaite, le miARN doit être associé à la protéine Ago2 puisque c'est la seule des 4 protéines Argonaute qui peut effectuer un clivage de l'ARNm.

Des règles précises ont été décrites dans la littérature pour comprendre les mécanismes de répression exercés par les miARN mais également pour définir des algorithmes permettant de prévoir les sites de ciblage des miARN.

Tout d'abord, il a été décrit par Lewis et ses collègues en 2003 que l'hybridation entre le miARN et l'ARN messager cible doit être parfaitement complémentaire entre les nucléotides 2 et 7 du miARN à partir de l'extrémité 5', cette région étant appelée « seed » (Lewis *et al.*, 2003). Un mésappariement dans cette région et notamment de type G:U entraînerait une diminution de l'efficacité de répression, diminution plus ou moins importante selon la taille de la région « seed » (Doench and Sharp, 2004 ; Brennecke *et al.*, 2005). Par exemple, si la région « seed » est composée seulement de six bases, un mésappariement de type G:U entraîne une perte complète de l'activité de répression. Par ailleurs, une augmentation de cette efficacité serait possible par la présence d'un résidu A en position 1 et/ou d'un résidu A/U en position 9, soit de part et d'autre de la région « seed » (Lewis *et al.*, 2005).

Une autre règle définit la présence, la plupart du temps chez les métazoaires, d'une boucle ou d'un court mésappariement dans la région centrale du duplexe miARN-ARNm, cela empêchant le clivage endonucléolytique catalysé par la protéine Ago2. Cela permet de distinguer le mécanisme de répression médié par les miARN chez les plantes et les métazoaires.

Une troisième règle définit qu'un appariement du côté 3' du miARN permet une stabilisation du duplexe miARN-ARNm, notamment lorsque cet appariement a lieu entre les nucléotides 13-16 du miARN (Grimson *et al.*, 2007).

D'autres facteurs peuvent également améliorer l'efficacité de répression tels que la richesse en dinucléotides AU à proximité du site de liaison du miARN, la proximité de ce site du codon stop ou de la queue polyA, notamment si l'ARNm a une extrémité 3'UTR longue (>1300nt). Cependant, le site de liaison du miARN ne doit pas être à moins de 15 nucléotides du codon stop sous peine d'une baisse importante d'efficacité de répression. En effet, ces 2 facteurs entraînent une structuration de cette extrémité moins importante et donc une meilleure accessibilité au complexe miRISC. Un troisième facteur est en effet la structuration de l'ARNm et son accessibilité par le miARN le ciblant. Un dernier facteur est la proximité du site de liaison avec des sites de liaison pour d'autres miARN, entraînant un phénomène répressif coopératif (Grimson *et al.*, 2007). L'ensemble de ces règles est résumé sur la figure 20.



Les miARN ciblent les ARNm dans la région 3' UTR à une distance supérieure de 15 nucléotides du codon stop. La première règle est la complémentarité parfaite en 5' dans la région « seed » entre les bases 2 et 7 du miARN (rectangle rouge). Un mésappariement central est présent chez les métazoaires empêchant le clivage endonucléolytique médié par Ago2 (différence principale avec l'interaction miARN/ARNm cible retrouvé chez les plantes). Un appariement en 3' de quelques nucléotides (notamment entre les bases 13 et 16) est nécessaire pour une meilleure stabilisation du duplexe miARN/ARNm cible (rectangle vert). La présence d'un A en position 1 et/ou un A/U en position 9 augmenterait l'efficacité de répression.

Plusieurs catégories de sites cibles ont donc été décrites (Lewis *et al.*, 2005 ; pour revue Bartel, 2009). On retrouve 2 catégories principales, les sites canoniques et les sites marginaux et plus rarement les sites atypiques (Figure 21). Les sites canoniques sont caractérisés par un appariement fort dans la région « seed » et comprennent 3 sortes de sites (8mer, 7mer-m8 et 7mer-A1). Les sites 8mer possèdent une interaction sur 8 nucléotides comprenant les 6 nucléotides de la région « seed » ainsi que le A en position 1 et le nucléotide en position 8. Les sites 7mer-m8 et 7mer-A1 comprennent les 6 nucléotides de la région « seed » ainsi que respectivement le nucléotide en position 8 ou le A en position 1. Les sites marginaux sont quant à eux caractérisés par un appariement plus faible dans cette région « seed », appariement de seulement 6 nucléotides, soit sur l'ensemble de la région « seed » (6mer), soit avec un décalage sur le nucléotide en position 8 (6mer offset). Enfin, dans les sites atypiques, on retrouve les sites possédant un appariement non négligeable en 3', comme les sites 3' supplémentaires ou les sites 3' compensatoires.

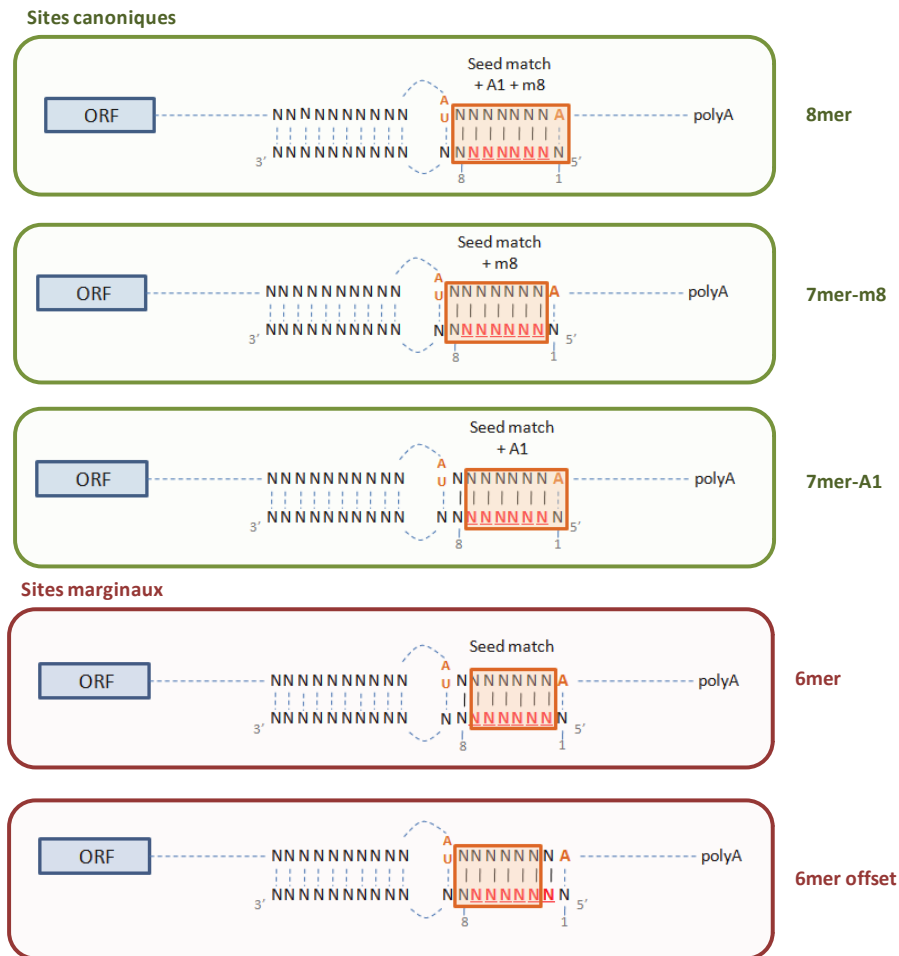


Figure 21 : Les trois catégories de sites cibles : canoniques, marginaux et atypiques
(Selon Bartel, 2009).

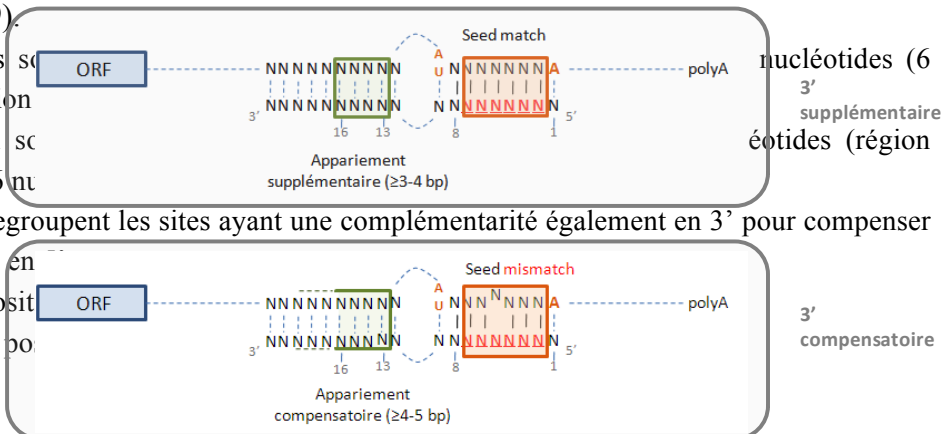
Les sites canoniques sont ceux qui ont une complémentarité parfaite ou 6 nucléotides (6 nucléotides de la région « seed » parfaite ou 6 nucléotides supplémentaires (région 3' compensatoire)).

Les sites marginaux sont ceux qui ont une complémentarité parfaite ou 6 nucléotides (6 nucléotides de la région « seed » parfaite ou 6 nucléotides supplémentaires (région 3' compensatoire)).

Les sites atypiques regroupent les sites ayant une complémentarité également en 3' pour compenser le faible appariement en 5'.

m8 : nucléotide en position 8

A1 : nucléotide A en position 1



c. Outils bioinformatiques pour la prédiction de sites cibles

Plusieurs bases de données ont été développées pour prédire les cibles des miARN dans les régions 3'UTR des ARNm chez les mammifères. Celles-ci sont basées sur plusieurs critères, comme par exemple, la stringence de la liaison du duplexe caractérisée par l'énergie de cette liaison, la conservation des sites cibles entre espèces ou encore le nombre de miARN ciblant une même partie 3'UTR. Les principaux outils bioinformatiques sont référencés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Outils bioinformatiques pour la prédiction de sites cibles chez les métazoaires (Selon Bartel, 2009).

Outils bioinformatiques	Critères	Site web	Références
Targetscan	1 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7	http://www.targetscan.org	Lewis <i>et al.</i> , 2003 Friedman <i>et al.</i> , 2009
TargetscanS	2 (ne requiert qu'un fort appariement sur 6nt) ; 4 ; 6 ; 7	http://www.targetscan.org	Lewis <i>et al.</i> , 2005
PicTar	1 ; 3 ; 4 ; 5	http://www.pictar.mdc-berlin.de	Krek <i>et al.</i> , 2005
MiRanda	2 ; 4 ; 5	http://www.microrna.org	John <i>et al.</i> , 2004 Betel <i>et al.</i> , 2008
Microcosm targets	Basé sur le logiciel MiRanda	http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/	Griffiths-Jones <i>et al.</i> , 2008
PITA Top	2 ; 4 ; 5 ; 7 ; 8	http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html	Kertesz <i>et al.</i> , 2007
EIMMo	1 ; 4 ; 5	http://www.mirz.unibas.ch/EIMMo2	Gaidatzis <i>et al.</i> , 2007
Diana-microT	2 ; 3 ; 4 ; 7	http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT	Kiriakidou <i>et al.</i> , 2004 Maragkakis <i>et al.</i> , 2009

1. Fort appariement dans la région « seed »
2. Appariement modéré dans la région « seed »
3. Mesure de stabilité thermodynamique
4. Conservation des sites cibles entre espèces
5. Nombre de sites cibles sur la région 3'UTR d'un même ARNm
6. Contexte de séquence (Positionnement du site par rapport au codon stop et queue polyA, richesse en AU)
7. Accessibilité du site cible
8. Réglage possible des paramètres de recherche

TargetscanS est considérée comme la nouvelle version, simplifiée et améliorée, de Targetscan. En effet, dans cette version, l'appariement nécessaire n'est que de 6 nucléotides dans la région « seed ». De plus, le nombre de sites cibles sur un même ARNm n'est pas requis dans cette nouvelle version de l'algorithme. Les trois outils bioinformatiques, TargetscanS, PicTar et EIMMo, possèdent un grand nombre de sites cibles en commun du fait de la recherche de sites ayant un fort appariement dans la région « seed ». L'homologie n'est pas parfaitement identique, notamment parce que, soit les bases de données UTR, soit les séquences miARN sont différentes selon les outils utilisés (Sethupathy *et al.*, 2006a). De plus, les algorithmes ont quelques différences intrinsèques concernant, par exemple, le traitement du nucléotide complémentaire à celui en position 1 du miARN. TargetscanS impose un A complémentaire de ce premier nucléotide alors que les deux autres algorithmes nécessitent n'importe quel appariement de type Watson-Crick en cette position (Bartel, 2009).

Il existe également un autre outil bioinformatique, appelé TarBase (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase>), qui recense l'ensemble des cibles vérifiées expérimentalement (Sethupathy *et al.*, 2006b ; Papadopoulos *et al.*, 2009) en différenciant bien les cibles confirmées et les cibles infirmées. Ces cibles ont pu être déterminées par différentes approches méthodologiques comme, par exemple, l'utilisation de gènes rapporteurs (Krek *et al.*, 2005 ; Kiriakidou *et al.*, 2004 ; Lewis *et al.*, 2003). Un autre outil intéressant est Targetcombo (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/TargetCombo.cgi>) qui compile un certain nombre de résultats, notamment ceux de TarBase, mais également l'union des cibles prédites par Diana-microT, TargetscanS, miRanda et PicTar et l'intersection des cibles prédites par ces trois derniers outils bioinformatiques (Sethupathy *et al.*, 2006a). L'avantage d'utiliser ce type d'outil est de diminuer le nombre de faux positifs.

3. Régulation de l'expression des ARNm cibles par les miARN

a. Généralités sur les ARNm : maturation, stabilité et traduction

Les ARNm sont tout d'abord maturés après leur transcription. Cette maturation consiste principalement en l'ajout d'une coiffe m⁷G en 5', en une extension polyA en 3' et en une étape d'épissage. L'ajout de la coiffe et l'extension polyA permettent d'assurer une meilleure stabilité de l'ARNm puisque l'encombrement stérique des complexes protéiques se liant à ces extrémités permet d'empêcher la dégradation de l'ARNm par des exonucléases.

D'autres protéines permettent la régulation de la stabilité de ces ARN comme les ARE-BP (AU-rich elements binding proteins) se fixant sur des éléments ARE (AU-rich elements) présents dans la région 3'UTR des ARNm, nommés ainsi car riches en dinucléotides AU.

Quant à la traduction des ARNm, elle a lieu en trois étapes une fois les ARNm maturés et exportés dans le cytoplasme : initiation, élongation et terminaison (Pestova *et al.*, 2001 ; Gebauer et Hentze, 2004). L'initiation s'effectue au niveau de la coiffe par association de la sous-unité ribosomique 40S, de l'ARNt méthionine initiateur et d'autres facteurs protéiques en un complexe 43S de pré-initiation et recrutement de ce complexe à la coiffe par le complexe eIF4F. La région 5'UTR de l'ARNm est ensuite balayée par le complexe 43S dans le sens 5'→3' jusqu'à la reconnaissance du codon initiateur AUG. Il y a ensuite dissociation de ce complexe et formation d'un autre complexe, 80S, constitué après fixation de la sous-unité ribosomique 60S. La traduction peut alors débiter.

Un autre mécanisme alternatif a été découvert pour initier la traduction sans recrutement d'un complexe protéique à la coiffe. Il s'agit de recrutement des ribosomes sur des IRES (Internal Ribosome Entry Site) (pour revue Kean, 2003). Ces séquences forment des structures secondaires en tige-boucle dans la région 5'UTR de l'ARNm et possèdent un codon initiateur à leur extrémité 3'. La sous-unité 40S vient donc directement se fixer au niveau du codon initiateur pour débiter la traduction. Le ribosome se déplace ensuite de codon en codon et associe chaque codon à l'ARNt apportant le bon acide aminé. Lorsque le ribosome atteint un codon stop, il y a action de facteurs de terminaison entraînant la dissociation du ribosome.

La plupart des régulations de la traduction affecte l'étape d'initiation (Gebauer et Hentze, 2004), notamment la régulation par les miARN.

b. Répression de l'initiation de traduction par les miARN

Plusieurs études, menées sur cellules en culture, ont montré que la coiffe fonctionnelle m⁷G est nécessaire au mécanisme d'inhibition de la traduction par les miARN puisque ce mécanisme ne s'applique pas lorsque les ARNm possèdent une coiffe ApppN non fonctionnelle ou lorsqu'ils sont traduits à partir des IRES (Humphreys *et al.*, 2005 ; Pillai *et al.*, 2005). Certains ARNm peuvent être bicistroniques, contenant un cistron traduit de manière coiffe-dépendante et un autre traduit par présence d'IRES. Dans ce cas là, seul la traduction du premier cistron est réprimée par let-7 (Pillai *et al.*, 2005). Le blocage de

l'initiation de la traduction par let-7 a été prouvé par étude de la distribution des ARNm dans des gradients de polysomes une fois let-7 fixé dans la région 3'UTR. En effet, ces ARNm se retrouvent après cette fixation dans les fractions les plus hautes du gradient, à savoir les moins bien traduites. La thèse de l'importance de la coiffe m7G dans la régulation de l'initiation de la traduction est renforcée par l'étude de Kiriadikou et al, dans laquelle a été montré que les protéines Ago possèdent des similitudes dans leur domaine central à celui du facteur eIF4E, facteur associé à la coiffe, essentiel pour l'initiation de la traduction. En effet, dans le domaine central de Ago2 sont retrouvés deux résidus phénylalanines qui sont nécessaires pour la liaison à la coiffe. Ces protéines entraîneraient donc l'inhibition de l'initiation de la traduction par association à la coiffe en compétition avec eIF4E (Kiriakidou *et al.*, 2007). Cette compétition de la machinerie miARN avec le facteur eIF4E ayant été précédemment décrite (Pillai *et al.*, 2005 ; Humphreys *et al.*, 2005).

Un autre mécanisme de répression de l'initiation de la traduction serait l'interaction du complexe miRISC avec le facteur eIF6. Ce facteur est impliqué dans l'inhibition de la biogenèse des ribosomes puisqu'il empêche l'association de la sous-unité 60S avec la sous-unité 40S. L'interaction de ce facteur avec miRISC entraînerait donc cette inhibition et par conséquent la répression de l'initiation de la traduction (Chendrimada *et al.*, 2007).

c. Répression de l'étape de post-initiation de la traduction par les miARN

Des études menées sur *C. elegans* ont mis en évidence que les ARNm lin-14 et lin-28, cibles du miARN lin-4, sont retrouvés associés aux polysomes, ceci étant corrélé avec une quantité de protéines traduites faible ; cette expression faible indiquant une répression effective de la traduction de ces ARNm (Olsen et Ambros, 1999 ; Seggerson *et al.*, 2002).

L'association des ARNm aux polysomes indiquant en principe une forte activité de traduction de ces ARNm ; cela prouverait donc que les miARN peuvent jouer un rôle d'inhibition de traduction à une étape de post-initiation. Ces observations ont également été le résultat de plusieurs études chez les mammifères. En effet, Petersen et ses collègues ont mis en évidence un nouveau mécanisme de répression de traduction, qui se déroule en phase de post-initiation puisque la traduction IRES-dépendante, *ie* coiffe-indépendante, peut être inhibée par les miARN. Ils confirment également que les miARN et leurs ARNm cibles sont présents, dans les fractions de polysomes en cours de traduction dans un gradient de sucrose.

L'utilisation de puromycine, molécule permettant de terminer précocement l'étape d'élongation de la traduction et donc de connaître s'il existe une activité peptidyl-transférase ribosomique, leur permet de conclure sur le fait que les ARNm cibles sont bien en cours de traduction puisque en présence de cette molécule, les miARN et ARNm se retrouvent finalement dans les fractions non traduites. Ils suggèrent donc que ce mécanisme de répression post-initiation est dû à un relargage précoce des ribosomes lors de la phase d'élongation, appelé « drop-off » (Petersen *et al.*, 2006). Une autre étude fait état d'une répression en post-initiation en étudiant la traduction de l'ARNm Kras, cible de let-7 dans des cellules HeLa (Maroney *et al.*, 2006). Let-7 entraîne une inhibition de l'expression de Kras et ces 2 ARN se retrouvent associés aux polysomes en cours de traduction. Mais dans ce cas, contrairement à ce qui a été observé par Petersen et ses collègues, en présence de puromycine, l'élongation n'est pas abortée complètement ; les auteurs ont donc suggéré plutôt un ralentissement de la vitesse d'élongation des ribosomes notamment pour ce cas de Kras. Une troisième étude s'est intéressée à ce mécanisme de répression post-initiation. Nottrott et ses collègues ont également décrit une association des miARN et ARNm dans les fractions de polysomes mais ils ont, quant à eux, penché plutôt pour une dégradation du polypeptide néo-synthétisé (Nottrott *et al.*, 2006).

d. Régulation par dégradation des ARNm cibles

Bien que de nombreuses études présentent des niveaux d'expression des ARNm cibles inchangés, des études plus récentes font état d'une déstabilisation de ces ARNm malgré une complémentarité imparfaite entre le miARN et son ARNm cible, comme par exemple let-7 diminuant la stabilité de lin-41 ou lin-4 diminuant celle de lin-14 et lin-28 chez *C. elegans* (Bagga *et al.*, 2005) mais également miR-125a et miR-125b régulant l'expression de lin-28 chez l'Homme par le même principe de diminution de stabilité (Wu et Belasco, 2005). Wu et ses collègues se sont donc intéressés à miR-125b et let-7 dans des cellules de mammifères et ont montré que ces miARN entraînent, après fixation sur leurs ARNm cibles, une suppression de la queue polyA de ces ARNm, mécanisme également appelé déadénylation (Wu *et al.*, 2006). Chez les eucaryotes, cette déadénylation serait au préalable initiée par le complexe PARN2/PARN3 puis effectuée par la suite par un complexe formé de deux déadénylases, CAF1 et CCR4 et de la protéine NOT (Parker et Song, 2004). Une fois déadénylés, les ARNm peuvent être dégradés à partir des deux extrémités. La dégradation 3'→5' de l'ARNm est

effectuée par des exosomes, complexes protéiques impliqués dans la dégradation des ARN. Quant à la dégradation 5'→3' de l'ARNm, elle est réalisée par l'exonucléase Xrn1 une fois l'ARNm ayant subi l'étape de décoiffage. Cette étape est réalisée chez l'Homme par un complexe formé principalement de DCP2 et de cofacteurs dont DCP1, EDC3, Ge-1 et RCK/p54 (Eulalio *et al.*, 2007). L'ensemble de ces protéines impliquées dans la dégradation 5'→3' sont localisées dans des granules cytoplasmiques appelées p-bodies (Processing bodies) (Ingelfinger *et al.*, 2002 ; Sheth et Parker, 2003 ; Parker et Song, 2004) contrairement aux exosomes (Brenques *et al.*, 2005).

Ces granules cytoplasmiques peuvent également être appelées *GW-bodies* dû à la forte présence de la protéine GW182. Cette protéine tient son nom de son poids moléculaire et du fait qu'elle possède des éléments répétés glycine-tryptophane (GW) (Eystathioy *et al.*, 2002). Cette protéine a la capacité de se lier aux protéines Argonaute, également présentes dans les p-bodies associées aux miARN et ARNm cibles (Liu *et al.*, 2005). Ces granules sont donc importants dans le phénomène d'ARN interférence. Sont retrouvés dans ces granules les ARNm étant écartés du processus de traduction. D'autres granules sont également le lieu de stockage d'ARNm écartés de ce processus de traduction et sont appelés *granules de stress* car ils sont formés dans le cytoplasme de cellules eucaryotes ayant subi un stress, comme par exemple, un stress oxydatif, un choc thermique ou une irradiation aux UV (Kedersha et Anderson, 2002). Deux études ont montré par technique d'immunofluorescence et utilisation d'anticorps spécifiques des p-bodies et granules de stress, que ces deux types de granules sont bien des structures indépendantes et distinctes (Cougot *et al.*, 2004 ; Kedersha *et al.*, 2005).

Les différents mécanismes de régulation de l'expression des ARNm cibles par les miARN sont présentés sur la figure 22.

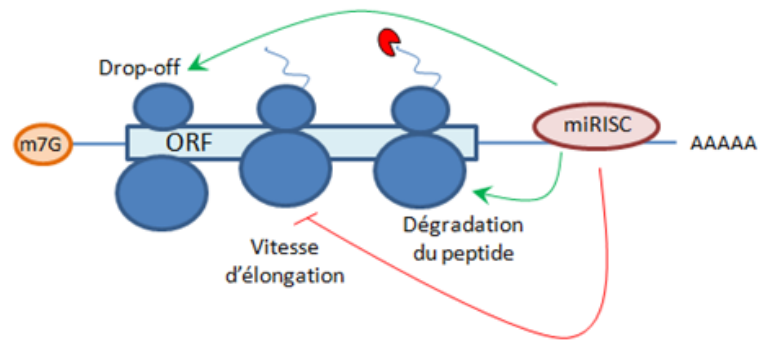
Figure 22 : Différents mécanismes de régulation de l'expression d'ARNm cibles par les miARN. Introduction

(A) Régulation par répression de l'initiation de la traduction. Cette régulation peut avoir lieu soit par inhibition de la fixation de l'eIF4E à la coiffe par compétition avec les protéines Ago, soit par inhibition du recrutement de la sous-unité ribosomique 60S.

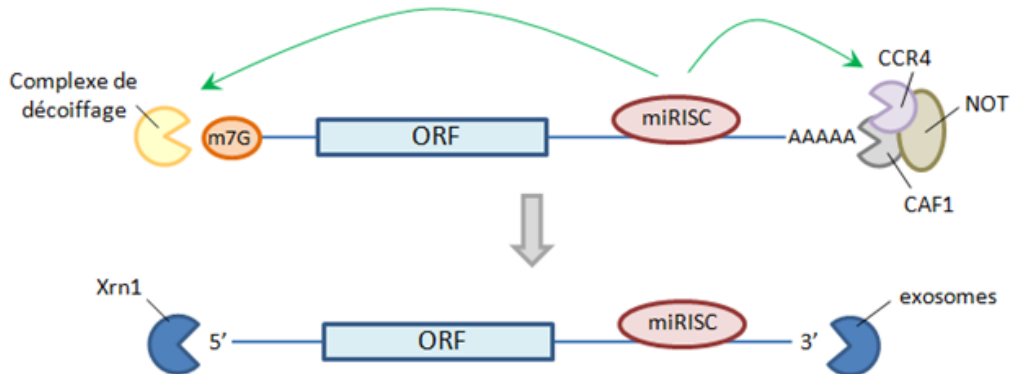
(B) Régulation par répression de l'étape de post-initiation de la traduction. 3 mécanismes ont été décrits : régulation soit par relargage précoce des ribosomes (drop-off), par baisse de la vitesse d'élongation ou par dégradation du peptide neo-synthétisé.

(C) Régulation par dégradation de l'ARNm. Un complexe formé de deux déadénylases (CCR4 et CAF1) et de la protéine NOT permet de supprimer la queue polyA. Le complexe de décoiffage permet ensuite d'ôter la coiffe à l'extrémité 5'. La dégradation de l'ARNm peut ainsi avoir lieu de 5' vers 3' par l'exonucléase Xrn1 ou de 3' vers 5' par les exosomes.

B. Répression de l'étape de post-initiation



C. Régulation par dégradation de l'ARNm



e. Cas particuliers d'activation de traduction

Dans la plupart des cas, les miARN jouent un rôle dans la régulation négative de l'expression génique par répression de traduction de l'ARNm cible ou par dégradation de cet ARNm. Cependant quelques cas de régulation positive par activation de traduction ont été observés, notamment dans des conditions de stress cellulaires. Les principaux éléments responsables de ce mécanisme sont les séquences ARE, séquences présentes dans la région 3'UTR des ARNm. En effet, Vasudevan et Steitz ont montré qu'en condition de privation des cellules en sérum, les protéines Ago2 et FXR1 se fixent à ces séquences ARE pour activer la traduction du facteur TNF α , une telle activation entraînant par la suite un arrêt du cycle cellulaire (Vasudevan et Steitz, 2007). La question suivante a donc été de savoir si les miARN jouent un rôle dans ce mécanisme d'activation de traduction par complémentarité avec les séquences ARE. Dans une autre étude, ces auteurs se sont donc intéressés à miR-369 qui est complémentaire par sa région « seed » à deux sites cibles de la séquence ARE de l'ARNm codant pour TNF α . Il a été montré que ce miARN permet, seulement en condition de privation en sérum, d'activer la traduction de TNF α et ce, par recrutement des protéines Ago2 et FXR1. La conclusion est que les miARN jouent un rôle de répresseurs de traduction dans des cellules en prolifération et d'activateurs lors de l'étape d'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1. Du complexe activateur formé par Ago2 et FXR1, seule Ago2 joue également un rôle dans le complexe de répression (Vasudevan *et al.*, 2007).

Les miARN jouent un rôle important dans la régulation traductionnelle puisque environ 60% des gènes codant pour des protéines sont la cible de miARN (Friedman *et al.*, 2009). Ils sont donc fortement impliqués dans de nombreux processus cellulaires tels que le développement, la différenciation, la prolifération, ou encore l'apoptose (Brennecke *et al.*, 2003; Bartel, 2004; Chen *et al.*, 2004 ; Harfe, 2005 ; Pasquinelli *et al.*, 2005), processus souvent dérégulés dans les tumeurs. L'implication des miARN aux processus de la tumorigenèse semble donc évidente et majeure.

IV- Les miARN dans le processus de tumorigenèse et de développement tumoral

1. Modifications des profils d'expression des miARN dans le cancer

a. Profils d'expression des miARN dans différents types de cancer

Différentes techniques existent pour le dosage des miARN comme la PCR quantitative, le northern blot ou les puces à ARN (microarrays), les techniques SAGE et RAKE et la cytométrie en flux quantitative; ces 4 dernières techniques permettant une étude à plus grande échelle, tant sur le nombre d'échantillons pouvant être testés que sur le nombre de miARN dosables. Une autre méthode a fait récemment son apparition pour le dosage de ces ARN, la technique de séquençage.

Deux études principales ont fait état du dosage d'un grand nombre de miARN dans plusieurs types de tumeurs, par technique de cytométrie en flux quantitative basée sur l'utilisation de billes (Lu *et al.*, 2005) ou par technique de microarray confirmée par Northern blot (Volinia *et al.*, 2006). Environ 1/4 des miARN étudiés ont été décrits comme significativement dérégulés dans au moins un type de tumeur. Ce nombre reste cependant une sous-estimation du nombre réel de miARN dérégulés puisque les miARN découverts ces dernières années n'ont pour l'instant pas été étudiés dans plusieurs types de tumeurs.

La première étude fait principalement état d'une sous-expression de miARN dans les tissus tumoraux en comparaison au tissu normal alors que la seconde fait plutôt état d'une large surexpression des miARN dans les tissus tumoraux. Bien que les études aient porté sur les mêmes types de tissu tumoral (sein, colon, poumon, pancréas, prostate et estomac), cela pourrait être expliqué soit par l'utilisation de deux plates-formes techniques différentes soit par la différence du nombre d'échantillons testés (Volinia *et al.*, 2006).

Wang et Lee ont recensé les dérégulations d'expression des miARN dans plusieurs types de cancers en prenant en compte les deux études précédentes ainsi que des études basées sur l'analyse d'un seul type de tumeur (Wang et Lee, 2009). Cela a permis de mettre en évidence qu'un certain nombre de miARN dont miR-21, miR-155, miR-221, miR-222 sont retrouvés surexprimés dans un grand nombre de tissus tumoraux (cerveau, thyroïde, cancers gastro-intestinaux, foie, poumon, sein). Certains miARN sont quant à eux, contrairement, plutôt retrouvés sous-exprimés dans les tissus tumoraux. On retrouve parmi ceux-là miR-143,

miR-145 ou encore le « cluster » let7/miR-98. Il existe cependant des études affirmant une contradiction sur la dérégulation de certains miARN dans un ou plusieurs types de tumeur. C'est par exemple le cas du « cluster » mir-17/92 surexprimé dans 7 types de tumeur et sous-exprimé dans trois autres ou encore miR-181b et miR-181c, retrouvés sous-exprimés dans les glioblastomes et pourtant surexprimés dans de nombreuses autres tumeurs. Cela pourrait être expliqué par le fait que certains miARN sont tissus-spécifiques, comme notamment miR-181b et miR-181c qui sont fortement exprimés dans les tissus cérébraux.

b. Dérégulations de l'expression des miARN par défauts dans le mécanisme de biogenèse

Des aberrations d'expression des protéines impliquées dans la machinerie de biogenèse et maturation des miARN ont été observées dans un certain nombre de cancers. Par exemple, une surexpression de Dicer a été associée à la présence de carcinomes du poumon et de lésions précurseurs d'adénocarcinomes de la prostate (Chiosea *et al.*, 2006 ; Chiosea *et al.*, 2007) alors qu'une diminution de son expression a été associée à un grade élevé de carcinomes ovariens, à un mauvais pronostic des tumeurs du poumon à petites cellules et au caractère invasif des adénocarcinomes du poumon (Karube *et al.*, 2005 ; Chiosea *et al.*, 2007 ; Merritt *et al.*, 2008). Une dérégulation d'expression de Drosha a également été associée à certains cancers, comme les carcinomes ovariens (Merritt *et al.*, 2008), les cancers cutanés épithéliaux (Sand *et al.*, 2010) ou les tumeurs de l'œsophage. Dans ce cas, une forte expression de Drosha dans les tumeurs de l'œsophage est associée à un mauvais pronostic de survie et la transfection de siRNA, ciblant l'ARNm codant pour Drosha dans des lignées cellulaires de tumeur de l'œsophage, entraîne une diminution significative de la prolifération de ces cellules (Sugito *et al.*, 2006).

Une autre étude a fait également état d'une régulation des complexes impliqués dans le mécanisme de biogenèse et de maturation des miARN tels Drosha/DGCR8 et Dicer/TRBP2 par les facteurs p53, p63 et p73 (Boominathan, 2010).

c. Dérégulations de l'expression des miARN par réarrangement chromosomique

Deux études ont mis en évidence que les gènes de miARN sont souvent retrouvés dans des régions chromosomiques fréquemment altérées dans les tumeurs (Calin *et al.*, 2004 ; Zhang *et al.*, 2006). Sur les 283 gènes codant pour des miARN connus à cette époque, 37%, 73% et 86% d'entre eux présentent une altération du nombre de copies dans le cancer de l'ovaire, le cancer du sein et le mélanome respectivement et une quarantaine est commune aux trois types de tumeurs (Zhang *et al.*, 2006). Il peut s'agir de régions ayant subi une translocation comme, par exemple, pour le gène codant pour miR-125b, surexprimé dans certaines leucémies par translocation t(2 ;11) (Bousquet *et al.*, 2008). Il peut également s'agir de régions amplifiées ou délétées. Un exemple est l'amplification de la région 17q23 dans les neuroblastomes (Saito-Ohara *et al.*, 2003), région dans laquelle se situe le gène codant pour miR-21, miARN fréquemment dérégulé dans les tumeurs. Un autre exemple est la présence d'une délétion de la région 13q14 dans de nombreux cas de leucémies lymphoïdes chroniques à cellules B. Sur cette région se trouvent les gènes codant pour miR-15a et miR-16-1, miARN qui sont effectivement souvent retrouvés sous-exprimés dans ces tumeurs (~68%) (Calin *et al.*, 2002).

d. Dérégulations de l'expression des miARN à cause de mutations ponctuelles

Bien qu'une étude ait mis en évidence que peu de mutations ponctuelles ou SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sont retrouvées dans les séquences des pre-miARN (Saunders *et al.*, 2007), certaines études ont montré que des SNP seraient responsables de différences d'expression des miARN entre tissus normaux et tissus tumoraux. La présence d'un SNP (G :C) dans la séquence du pré-miARN 146a a été mise en évidence et associée à plusieurs types de tumeurs. Quelques études ont montré que ce SNP entraînerait une diminution de l'expression du miARN mature miR-146a, que ce soit dans le carcinome papillaire de la thyroïde (Jazdzewski *et al.*, 2008) ou dans le cancer de la prostate (Xu *et al.*, 2010) par exemple. De plus, une hétérozygotie G/C serait associée à un risque plus élevé d'être affecté par le carcinome papillaire de la thyroïde que les homozygoties G/G et C/C (Jazdzewski *et al.*, 2008) alors qu'une homozygotie C/C permettrait de réduire le risque de près de 2 fois de développer un cancer de la prostate, en comparaison aux génotypes G/G et

G/C (Xu *et al.*, 2010). Un autre SNP (G :U) a été identifié par Duan et ses collègues à 8 nucléotides du début de la séquence du miARN mature miR-125a, ie dans la région « seed », ce qui pourrait avoir un impact sur l'interaction miARN-ARNm cible (Duan *et al.*, 2007) et l'hétérozygotie G/U a été retrouvée dans quelques cas de cancer du sein par cette même équipe (Li *et al.*, 2009). Une autre étude s'est également intéressée à la recherche de SNP dans le cas du cancer du poumon non à petites cellules (Hu *et al.*, 2008). Les auteurs ont trouvé un SNP (T :C) touchant le pré-miR-196a-2 et les patients présentant une homozygotie C/C auraient un taux de survie plus faible que ceux avec un génotype T/T ou T/C.

e. Dérégulations de l'expression des miARN par régulation transcriptionnelle

L'expression des miARN peut également être régulée par des facteurs de transcription lors de l'étape de transcription des gènes par l'ARN polymérase II. Ohler et ses collègues se sont intéressés aux séquences « flanquantes » des gènes codant les miARN chez *C. elegans* mais également chez l'Homme et ont observé des motifs impliqués dans la régulation transcriptionnelle (Ohler *et al.*, 2004). Plusieurs études ont mis en évidence un certain nombre de facteurs impliqués dans ce phénomène de régulation, tels p53, E2F ou encore Myc.

Plusieurs études se sont intéressées à la protéine p53, connue pour être un suppresseur de tumeur et ont mis en évidence une régulation de la transcription de plusieurs miARN par ce facteur de transcription (Xi *et al.*, 2006), notamment une activation de la transcription du gène mir-34a, et ce par fixation sur la région promotrice du gène (Chang *et al.*, 2007; Raver-Shapira *et al.*, 2007 ; Tarasov *et al.*, 2007). Une autre étude a montré, quant à elle, une répression de l'activation d'un certain nombre de miARN par p53, non pas par fixation sur les régions promotrices cette fois mais indirectement par inhibition du facteur de transcription E2F1 (Brosh *et al.*, 2008). Bueno et ses collègues ont également présenté une augmentation d'expression de quelques miARN, après activation par les facteurs de transcription appartenant à la famille E2F (Bueno *et al.*, 2010). Un autre facteur de transcription, Myc, oncogène, a été décrit comme modulateur de l'expression d'un grand nombre de miARN. En effet, Myc a été montré comme activateur de l'expression du « cluster » miR-17/92 par exemple (O'Donnell *et al.*, 2005) mais également comme répresseur de l'expression d'un grand nombre de miARN impliqués dans les processus de prolifération (Chang *et al.*, 2008), et ce par fixation sur les régions promotrices.

La régulation de la transcription pouvant expliquer une modulation du taux des miARN peut également être le résultat de modifications épigénétiques au niveau des régions promotrices des gènes codant ces ARN. La principale modification épigénétique est la méthylation de l'ADN. Ce phénomène est réversible et ne concerne que les cytosines appartenant aux dinucléotides CpG (signifiant que la guanine est en position 3' de la cytosine). On retrouve dans les régions promotrices, des séquences enrichies en ces dinucléotides, que l'on appelle communément « îlots CpG ». Ce phénomène de méthylation permet une régulation du niveau d'expression des gènes puisque d'une part il joue sur l'état de compaction de la chromatine et donc sur la capacité des facteurs de transcription à venir se fixer sur les régions promotrices et d'autre part favorise la fixation de protéines MBD (méthyl-DNA binding) (Tate *et al.*, 1993). Quelques études ont mis en évidence que la méthylation de l'ADN entraîne une répression de l'expression des miARN puisque l'utilisation dans des lignées cellulaires tumorales de drogues permettant une déméthylation de l'ADN a permis de mettre en évidence une surexpression de plusieurs miARN (Saito *et al.*, 2006a; Saito *et al.*, 2006b; Lujambio *et al.*, 2007). Plusieurs miARN ont été étudiés plus spécifiquement comme par exemple miR-124 (Lujambio *et al.*, 2007) et miR-34a (Lodygin *et al.*, 2008) dont l'expression plus faible dans les lignées cellulaires ou tissus tumoraux est due à une hyperméthylation des îlots CpG ou encore miR-128 (Mi *et al.*, 2007) et let-7a-3 (Brueckner *et al.*, 2007), surexprimés, quant à eux, par hypométhylation des îlots CpG.

Plusieurs altérations génétiques, dont des réarrangements chromosomiques ou mutations ponctuelles, ont été mises en évidence comme expliquant les différences d'expression des miARN entre tissus tumoraux et tissus normaux. Ces altérations génétiques sont donc importantes dans le processus de tumorigenèse puisqu'elles empêchent une bonne régulation des processus cellulaires par les miARN. Cependant, ces types d'altérations peuvent également affecter les séquences d'ARNm cibles des miARN et entraîner des modifications de régulation génique par perturbations de l'hybridation miARN/ARNm cible.

2. Modifications affectant l'hybridation miARN/ARNm cible

a. Dérégulations par modification chromosomique

Des altérations telles des délétions, insertions ou translocations peuvent survenir dans les régions 3'UTR des ARNm cibles. Une étude a mis en évidence qu'une insertion de 4 nucléotides TTCA dans la région 3'UTR de l'ARNm d'IL-1 α affecte considérablement la liaison de cet ARNm cible avec miR-122 et miR-378 et a une influence significative sur la régulation de l'expression d'IL-1 α . De plus, une association forte a été trouvée entre la présence de l'allèle muté et le risque de développer un carcinome hépatocellulaire dans la population chinoise (Gao *et al.*, 2009). Des études menées sur les lymphomes des cellules du manteau ont montré une forte expression de CCND1 dans ces tumeurs due à des délétions et mutations dans la région 3'UTR de l'ARNm de CCND1 (Wiestner *et al.*, 2007). Chen et ses collègues ont ensuite prouvé que ces modifications génétiques entraînent une altération de la liaison ARNm avec miR-16, altération à l'origine de l'augmentation de l'expression de cette protéine CCND1 (Chen *et al.*, 2008). La partie 3'UTR de l'ARNm codant pour HMGA2 peut subir une translocation conduisant à son élimination et donc à l'impossibilité pour let-7 de venir cibler cette région pour réguler l'expression de HMGA2 (Mayr *et al.*, 2007). Cette protéine a été montrée comme impliquée dans la tumorigenèse d'un grand nombre de tumeurs malignes comme le cancer du poumon (Sarhadi *et al.*, 2006 ; Meyer *et al.*, 2007; Di Cello *et al.*, 2008) ou du pancréas (Abe *et al.*, 2003).

b. Dérégulations par mutations ponctuelles

Yu et ses collègues ont recherché des SNP dans les régions 3'UTR des ARNm complémentaires des miARN décrits à cette époque et ont observé une plus faible présence de SNP dans les régions complémentaires de la région « seed » des miARN que dans le reste des régions 3'UTR (Yu *et al.*, 2007). Cela met en évidence une pression de sélection indiquant l'importance de la régulation par les miARN.

De plus en plus d'études s'intéressent aux SNP dans les régions complémentaires des miARN dans un contexte tumoral. He et ses collègues ont décrit deux SNP dans la région 3'UTR de l'ARNm de KIT (récepteur à tyrosine kinase) dans le cas du carcinome papillaire de la thyroïde. Ces SNP (G :A et G :C) affectent la liaison de cet ARNm avec les miARN

miR-221/222 et miR-146a/146b respectivement et augmenteraient l'expression de la protéine KIT, augmentation à l'origine du risque de développer ce type de cancer (He *et al.*, 2005a). Un SNP (G :C) dans la région 3'UTR de l'ARNm de CD86 a été retrouvé comme étant associé à un risque accru de cancer colorectal sporadique. Ce site est la cible de cinq miARN ; trois d'entre eux voient leur affinité de liaison à l'ARNm diminuer contrairement aux deux autres, suggérant que le SNP produisant l'effet le plus important dans les liaisons miARNs/ARNm cible soit celui étant le plus fortement associé au risque de développement tumoral (Landi *et al.*, 2008). Une autre étude a été menée sur le cancer du poumon non à petites cellules chez des patients étant des fumeurs modérés avec la recherche de SNP dans la région 3'UTR de l'ARNm de KRAS (Chin *et al.*, 2008). Cet ARNm est la cible de la famille de let-7 et il existe 10 sites cibles dans cette région pour cette famille de miARN. Les auteurs de cette étude n'ont trouvé qu'un SNP par site cible et parmi les 10 SNP, la plupart sont retrouvés peu fréquemment dans les tumeurs. Seul un SNP (T :G) a été retrouvé dans près de 20% des tumeurs et pouvant donc être associé à un risque accru de ce type de tumeurs. Une telle mutation entraîne bien une augmentation de l'expression de l'ARNm KRAS *in vitro* et est corrélée avec une expression plus faible de la plupart des miARN de la famille let-7. Le cancer du sein a également fait l'objet d'une étude, et plus particulièrement les intégrines, protéines impliquées dans le contrôle de l'attachement cellulaire à la matrice extracellulaire. Des SNP ont été mis en évidence dans les régions 3'UTR des ARNm codant ces protéines et plus particulièrement ITGB4. Il a été montré une forte association entre la présence de l'allèle mutée et le statut négatif des récepteurs hormonaux dans les tumeurs du sein (Brendle *et al.*, 2008).

Des miARN peuvent être considérés comme oncogènes lorsque une augmentation de leur expression contribue à la transformation maligne de cellules normales ou comme suppresseurs de tumeur dans le cas contraire. Pour pouvoir avoir ce statut d'oncogènes ou suppresseurs de tumeur, les miARN doivent généralement être retrouvés dérégulés dans un grand nombre de types de tumeur. De plus, la transformation maligne induite par la dérégulation des miARN doit être étudiée par un certain nombre de tests *in vitro* comme les tests de prolifération, d'apoptose ou *in vivo* comme l'évaluation de la formation de tumeurs et du développement tumoral chez des souris.

3. miARN oncogènes et suppresseurs de tumeur

a. miARN oncogènes

Voici quelques exemples de miARN considérés comme oncogènes :

- **miR-372/373**

L'activation de RAS dans des cellules primaires induit une sénescence des cellules, phénomène outrepassé après acquisition d'anomalies génétiques telles qu'une perte de p53. Voorhoeve et ses collègues ont montré que lorsque les miARN miR-372 et miR-373 sont surexprimés, ils peuvent remplacer ce type d'anomalies génétiques pour permettre, en présence d'une activation de RAS, d'induire la prolifération des cellules. Une telle surexpression a été mise en évidence notamment dans les tumeurs « testicular germ cell » et ces deux miARN entraînent la formation de tumeurs chez des souris immunotolérantes (Voorhoeve *et al.*, 2006).

- « Cluster » **miR17-92**

Ce « cluster » est composé de six miARN : miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a et miR-92, fortement surexprimés dans un grand nombre de tumeurs comme par exemple dans les lymphomes des cellules B (He *et al.*, 2005b). Une étude *in vitro* a montré l'induction de prolifération de cellules tumorales de poumon par ces miARN (Hayashita *et al.*, 2005). *In vivo*, He et ses collègues ont mis en évidence un développement tumoral accéléré dans un modèle de lymphome à cellules B chez la souris lorsque le « cluster » miR-17/92 est surexprimé.

- **miR-21**

miR-21 a été décrit comme surexprimé dans 15 types de cancers (Wang et Lee, 2009) et, transfecté dans des cellules épidermiques de souris ou dans des lignées cellulaires de cancer du sein, il permet la formation de colonies sur agar mou par régulation de PDCD4 (Lu *et al.*, 2008). Cette protéine est souvent sous-exprimée dans les tumeurs du poumon et du colon (Chen *et al.*, 2003; Mudduluru *et al.*, 2007) et sa répression par miR-21 entraîne une induction des phénomènes d'invasion et de métastase dans des cellules de cancer colorectal par exemple (Asangani *et al.*, 2008). Une autre des cibles de miR-21 est TPM1, protéine absente dans certains cas de cancer comme par exemple dans les cellules épithéliales dans le

cancer du sein (Zhu *et al.*, 2007) et qui a pour rôle principal d'inhiber la croissance cellulaire et la réorganisation des filaments.

- **miR-155**

miR-155 est localisé dans le dernier exon du gène BIC (B-cell Integration Cluster) (Eis *et al.*, 2005), et une étude réalisée chez le poulet a montré une accélération de la lymphomagenèse par BIC et plus particulièrement par son dernier exon, et ce par médiation par MYC (Tam *et al.*, 2002). Ce miARN a souvent été décrit comme surexprimé dans diverses tumeurs, notamment dans différents types de lymphomes tels que les lymphomes diffus à grandes cellules (Eis *et al.*, 2005), les lymphomes hodgkiniens (Kluiver *et al.*, 2005) ou encore les lymphomes de Burkitt (Kluiver *et al.*, 2006) mais également dans le cancer du sein ou du poumon (Volinia *et al.*, 2006). Une étude *in vivo* a mis en évidence que la surexpression de ce miARN dans un modèle de souris transgéniques est suffisante pour entraîner une lymphomagenèse (Costinean *et al.*, 2006).

b. miARN suppresseurs de tumeur

- **let-7**

La famille de let-7 comprend 12 miARN qui ne se différencient que par quelques bases et qui sont répartis en 8 « clusters » géniques, dont 4 se situent dans des régions chromosomiques « fragiles » (Calin *et al.*, 2004). Plusieurs miARN de cette famille ont une expression plus faible dans les tissus tumoraux que dans les tissus normaux, et ce dans les tumeurs du sein et du poumon principalement (Iorio *et al.*, 2005; Yanaihara *et al.*, 2006). Plusieurs études ont mis en évidence une corrélation entre une faible expression de let-7 dans les tumeurs du poumon (Johnson *et al.*, 2005) ou lignées cellulaires de cancer du colon (Akao *et al.*, 2006) et une forte expression de la protéine RAS.

De plus, d'autres oncogènes sembleraient être les cibles de cette famille de miARN dont HMGA2 (Lee et Dutta, 2007) et MYC (Akao *et al.*, 2006 ; Sampson *et al.*, 2007). HMGA2 est retrouvé surexprimé dans un grand nombre de cancers comme dans 90% des cas de cancers du poumon et la présence de cette protéine est corrélée avec une forte prolifération cellulaire et un faible taux de survie dans le cas du cancer du poumon (Sarhadi *et al.*, 2006). La surexpression de cet oncogène a été montrée comme corrélée à une sous-expression de certains membres de la famille let-7 puisque ces miARN entraînent la dégradation de l'ARNm de HMGA2.

Concernant MYC, son expression a également été montrée comme régulée négativement par let-7 dans le cancer du colon par Akao et al (Akao *et al.*, 2006). Une autre étude a mis en évidence par transfection de pre-let-7a dans des cellules de lymphomes, une sous-expression de MYC et une baisse de la prolifération de ces cellules (Sampson *et al.*, 2007).

- **miR-15a et miR-16-1**

Ces deux miARN sont regroupés en « cluster » dans une région chromosomique souvent délétée dans le cancer de la prostate mais également dans les leucémies lymphocytaires chroniques (Dong *et al.*, 2001 ; Calin *et al.*, 2002). Dans ces tumeurs, Calin et ses collègues ont montré que ces deux miARN sont sous-exprimés dans près de 70% des cas. Ils ont réalisé une étude *in vivo* pour assurer du caractère de suppresseurs de tumeur de ces deux miARN puisqu'ils permettent d'inhiber la croissance tumorale après augmentation de leur taux par transfection de cellules leucémiques et injection de ces cellules dans des souris nude (Calin *et al.*, 2008).

D'autres miARN, souvent sous-exprimés dans les tumeurs, sont également considérés comme suppresseurs de tumeur comme miR-1 ou miR-7. En effet, ces miARN surexprimés respectivement dans des cellules cancéreuses de poumon ou du sein réduisent la prolifération de ces cellules et la capacité de formation de tumeurs dans des souris immunotolérantes (Nasser *et al.*, 2008 ; Reddy *et al.*, 2008).

4. miARN impliqués dans les voies moléculaires du développement tumoral

Les miARN peuvent contrôler de nombreuses voies de signalisation comme l'apoptose, la prolifération cellulaire ou l'angiogenèse par exemple.

a. Processus d'apoptose et de prolifération cellulaire

Le processus d'apoptose peut être activé via deux voies, la voie intrinsèque ou extrinsèque. Dans la voie intrinsèque sont impliqués plusieurs membres pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la famille de BCL2 qui sont contrebalancés pour réguler la perméabilité de la membrane mitochondriale. Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xl, souvent

surexprimées dans les tumeurs (Igney et Krammer, 2002 ; Bush et Li, 2003 ; Coultas et Strasser, 2003), empêchent cette perméabilisation par inhibition des protéines pro-apoptotiques cytosoliques BAX et BAK (Reed *et al.*, 1998). Suite à un stress cellulaire, une activation de la transcription se produit concernant certains membres pro-apoptotiques de la famille de BCL2, tels que PUMA et NOXA, par activation transcriptionnelle de p53. Cette activation va permettre d'activer par la suite les protéines BAX et BAK et de les faire migrer vers la membrane mitochondriale où elles vont permettre une perméabilisation de la membrane mitochondriale, perméabilisation permettant entre autre le relargage du cytochrome c dans le cytosol (Henry-Mowatt *et al.*, 2004). Le cytochrome c se lie à la protéine APAF-1 (Apoptotic Protease-Activating Factor-1) ainsi qu'à deux procaspases-9 pour former l'apoptosome, complexe protéique qui permet, une fois formé, de libérer la caspase 9, caspase « initiatrice » d'apoptose (Li *et al.*, 1997). Une fois activée, cette caspase clive les caspases « effectrices » comme les caspases 3, 6 ou 7. L'activation de ces caspases est inhibée en condition normale par des protéines, appelées IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein), elles-mêmes inhibées par la protéine SMAC/DIABLO, libérée également dans le cytosol après perméabilisation de la membrane mitochondriale (Du *et al.*, 2000 ; Verhagen *et al.*, 2000).

Quant à la voie extrinsèque, elle débute hors de la cellule avec une activation de récepteurs pro-apoptotiques présents à la surface de la cellule par des ligands tels que CD95L (FAS-L). Après reconnaissance des ligands par les domaines extracellulaires des récepteurs, les domaines intracellulaires se lient à la protéine FADD (Fas-associated Death Domain) (Chinnaiyan *et al.*, 1995). Le complexe ainsi formé recrute la procaspase-8 ou 10 et les active en caspase 8 ou 10, qui sont des caspases « initiatrices » au même titre que la caspase 9. Les caspase 8 et 10 convergent ensuite vers la voie intrinsèque puisqu'elles vont permettre d'activer les caspases « activatrices » 3, 6 ou 7. Les caspases 8 et 10 peuvent également cliver la protéine Bid inactive, qui devient active une fois tronquée. La protéine tronquée, tBid, permet la relocalisation de BAX et BAK (Eskes *et al.*, 2000).

Plusieurs miARN ont été montrés comme pouvant réguler ces voies apoptotiques et ce à plusieurs niveaux. D'une part, plusieurs protéines de la famille de BCL2 sont régulées par ce mécanisme, comme Bcl-2 dont l'ARNm est la cible de miR-15a/16 et dont une corrélation inverse entre le taux de cette protéine et de ces miARN a été mise en évidence (Cimmino *et al.*, 2005). La protéine Bcl-xl est, quant à elle, inhibée par la protéine pro-apoptotique Bim, elle-même régulée par certains miARN des « clusters » miR-17/92 et miR-106b/25. En effet,

le « cluster » miR-17/92 est nécessaire dans le développement des cellules B par régulation de l'expression de Bim et est retrouvé surexprimé dans un grand nombre de cancers dont les lymphomes à cellules B (Ventura *et al.*, 2008). Quant au « cluster » miR-106b/25, il a été observé comme surexprimé dans de nombreux cancers gastriques et de la prostate et certains des miARN, notamment miR-106b, cibleraient Bim mais également p21, protéine impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, et E2F1 (Ambs *et al.*, 2008 ; Petrocca *et al.*, 2008). miR-34a est également un régulateur important de l'initiation de la voie d'apoptose puisque ce miARN inhibe la désacétylase SIRT1 ; inhibition entraînant l'acétylation de p53 et donc l'augmentation de son activité transcriptionnelle et l'induction de la protéine pro-apoptotique PUMA (Yamakuchi *et al.*, 2008). Une étude récente a mis en évidence que cette protéine PUMA serait la cible directe de deux miARN miR-221/222 dans les cellules de glioblastomes (Zhang *et al.*, 2010). Ces deux miARN ont également un rôle important dans la prolifération cellulaire par régulation de l'expression de p27^{Kip1} (le Sage *et al.*, 2007).

La deuxième partie de la voie intrinsèque mettant en jeu la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases est également régulée par des miARN. Par exemple, miR-1 et miR-133 proviennent du même polycistron et sont transcrits ensemble mais leur implication dans l'apoptose est opposée puisque miR-1 est considéré comme pro-apoptotique alors que miR-133 serait anti-apoptotique. En effet, miR-1 a pour cibles les protéines anti-apoptotiques HSP60 et HSP70, protéines empêchant la formation de l'apoptosome. Quant à miR-133, il a pour rôle de réprimer l'expression de la caspase 9 (Xu *et al.*, 2007). miR-21 joue également un rôle anti-apoptotique intéressant préalablement observé dans les cellules de glioblastomes (Chan *et al.*, 2005), dans lesquelles ce miARN régule l'expression des protéines APAF-1, caspase 3 et PDCD4 (Papagiannakopoulos *et al.*, 2008) ; PDCD4 pouvant également réguler l'activité de la caspase 3 (Bitomsky *et al.*, 2008).

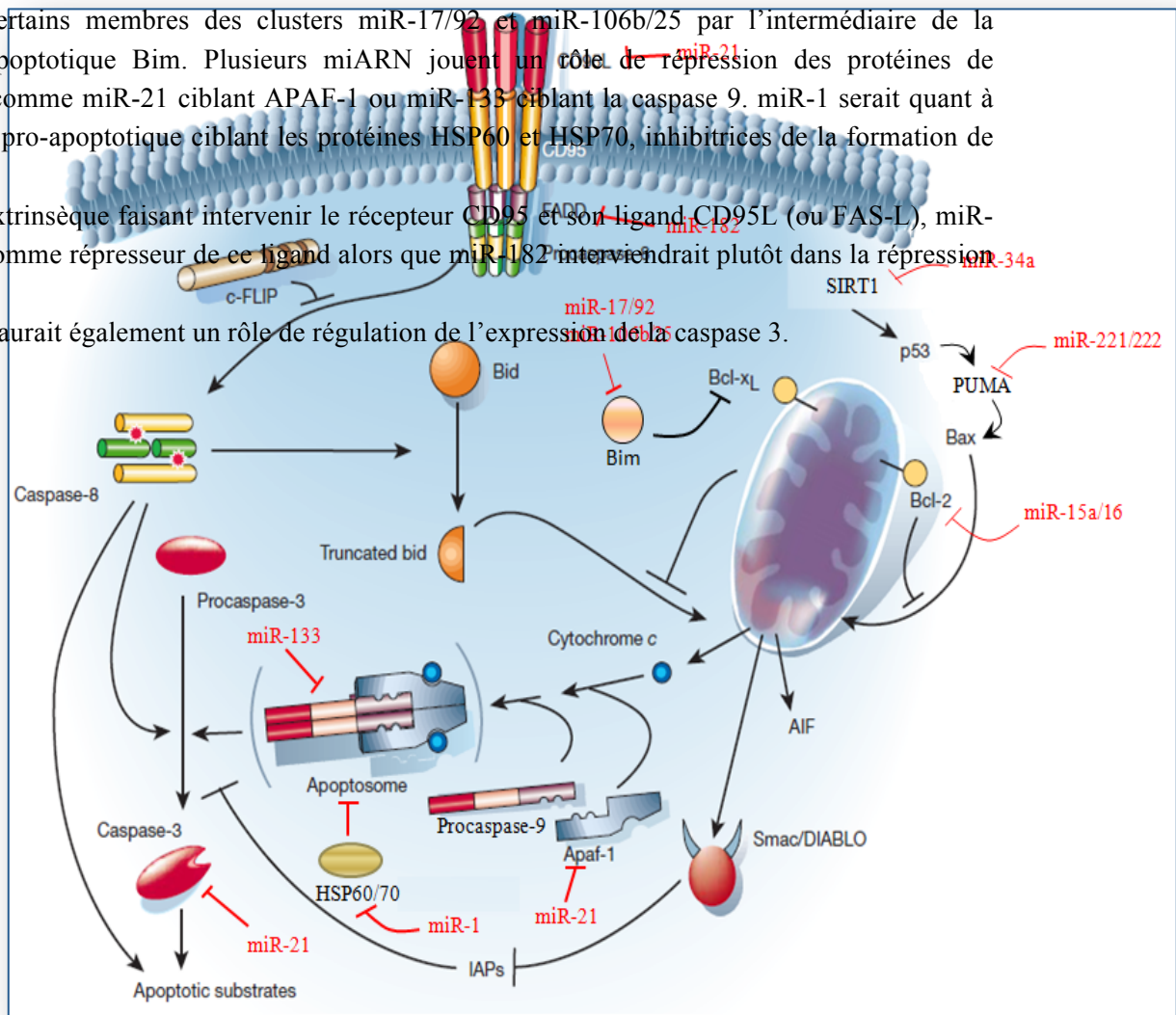
La voie extrinsèque est également la cible de miARN comme miR-21 qui cible FAS-L (Sayed *et al.*, 2010) ou miR-182 qui a pour cible la protéine FADD (Ovcharenko *et al.*, 2007).

Figure 23 : Implication des miARN dans le processus d'apoptose (selon Vecchione et Croce, 2010). *Introduction*

Dans la voie intrinsèque, la protéine pro-apoptotique PUMA est la cible de miR-221/222 et est régulée par p53, cible de la protéine SIRT1, elle-même régulée par miR-34a. Les protéines anti-apoptotiques de ce mécanisme, Bcl-2 et Bcl-xL sont respectivement les cibles soit directe de miR-15a/16 soit indirecte de certains membres des clusters miR-17/92 et miR-106b/25 par l'intermédiaire de la protéine pro-apoptotique Bim. Plusieurs miARN jouent un rôle de répression des protéines de l'apoptosome comme miR-21 ciblant APAF-1 ou miR-133 ciblant la caspase 9. miR-1 serait quant à lui un miARN pro-apoptotique ciblant les protéines HSP60 et HSP70, inhibitrices de la formation de l'apoptosome.

Dans la voie extrinsèque faisant intervenir le récepteur CD95 et son ligand CD95L (ou FAS-L), miR-21 intervient comme répresseur de ce ligand alors que miR-182 interviendrait plutôt dans la répression de FADD.

Enfin, miR-21 aurait également un rôle de régulation de l'expression de la caspase 3.



b. Processus d'angiogenèse

Une des étapes clés de la progression tumorale est l'angiogenèse qui consiste en la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Le contrôle de cette étape par des miARN a été mis en évidence par perturbation de l'expression de Dicer et Drosha dans des cellules endothéliales. En effet, un « knockdown » de Dicer ou Drosha entraîne une diminution d'angiogenèse avec un effet plus important pour le « knockdown » de Dicer (Kuehbacher *et al.*, 2007 ; Suarez *et al.*, 2007). Plusieurs études ont analysé les taux d'expression des miARN dans les cellules endothéliales et mis en évidence leurs propriétés pro-angiogéniques *in vivo* (miR-126, miR-378, miR-296 ou le « cluster » miR-17/92) ou *in vitro* (miR-210, let-7f, miR-27b, miR-130a) ou anti-angiogéniques (miR-221/222, miR-15b ou miR-16) (pour revue Wang et Olson, 2009). miR-126, seul miARN spécifique des cellules endothéliales, a été étudié *in vivo* chez la souris, modèle dans lequel la baisse d'expression est corrélée à une diminution de l'angiogenèse et du maintien de l'intégrité vasculaire (Wang *et al.*, 2008). D'autres miARN, non spécifiques des cellules endothéliales, comme miR-378, miR-296 ou le « cluster » miR-17/92, ont également un caractère pro-angiogénique mis en évidence par modulation de leur taux dans des cellules tumorales réinjectées ensuite dans des souris nude (Dews *et al.*, 2006 ; Lee *et al.*, 2007 ; Wurdinger *et al.*, 2008). D'autres miARN ont également des propriétés pro-angiogéniques importantes, observées *in vitro*. C'est le cas par exemple de miR-210, miARN induit en conditions hypoxiques, dont la surexpression dans des cellules endothéliales en culture stimule la migration cellulaire et la formation de structures similaires à des capillaires, et ce par répression de l'Ephrin-A3 (Fasanaro *et al.*, 2008). Quant au miR-130a, il ciblerait les ARNm codant pour les protéines anti-angiogéniques GAX et HOXA5 qui lui conférerait ses propriétés pro-angiogéniques (Chen et Gorski, 2008). Certains miARN seraient plutôt des facteurs anti-angiogéniques comme miR-221/222 dont la surexpression *in vitro* dans des cellules endothéliales entraîne une diminution de la migration cellulaire ainsi que la formation des structures similaires aux capillaires par répression de KIT (Poliseno *et al.*, 2006). Les miARN miR-15b et miR-16 ont pour cible l'ARNm codant pour VEGF et ont par ce fait des propriétés anti-angiogéniques (Hua *et al.*, 2006).

Partie III- Présentation et objectifs de la thèse

Les méningiomes, bien que souvent considérés comme bénins, peuvent présenter des caractéristiques morphologiques inquiétantes avec une infiltration des tissus adjacents. Un tel phénotype peut entraîner en ce qui concerne l'exérèse chirurgicale, préconisée comme traitement de choix pour ces tumeurs, une incapacité à ôter la tumeur dans son ensemble et être donc à l'origine de récurrences fréquentes. Les méningiomes font principalement l'objet d'analyses cytogénétiques qui sont bien corrélées au grade OMS de ces tumeurs. Si quelques marqueurs ont pu être mis en évidence pour comprendre la physiopathologie des méningiomes en général, peu d'études se sont intéressées à ce phénotype invasif.

Les tumeurs gliales sont des tumeurs malignes dont l'agressivité est souvent synonyme de survie très réduite pour les patients. La compréhension des caractéristiques physiopathologiques de ces tumeurs est encore loin d'être acquise. Tout effort réalisé pour combler cette carence pourrait aider à plus ou moins long terme pour la prise en charge thérapeutique de ces pathologies morbides.

Dans ce contexte de recherche bio-clinique, ma thèse comportait donc deux grands axes :

Le premier axe concernait l'étude des méningiomes et avait cinq objectifs :

1. Mettre au point des méthodes *in vitro* pour caractériser le phénotype invasif des méningiomes.
2. Mettre au point des méthodes d'analyse transcriptomiques à haut débit.
3. Evaluer les variations d'expression de gènes (profils ARNm) distinguant les deux types de méningiomes.
4. Recenser les miARN dont l'expression est dérégulée dans les méningiomes invasifs par rapport aux méningiomes non invasifs.
5. Interpréter le rôle des variations d'expression des ARNm et des miARN dans le développement du phénotype invasif.

Le deuxième axe de recherche était focalisé sur les gliomes avec les objectifs suivants :

1. Etudier les différences d'expression des miARN dans des tumeurs gliales de deux types différents, à savoir des tumeurs oligodendroiales de grade A ou B selon la classification de l'Hôpital Sainte-Anne et des glioblastomes (Annexe 1).
2. Valider les applications potentielles pour le diagnostic de la découverte de signatures spécifiques de ces deux types de tumeurs.
3. Explorer les caractéristiques moléculaires de ces tumeurs afin de rationaliser les variations d'expression des miARN.
4. Comprendre l'impact des variations d'expression des miARN sur la physiopathologie des tumeurs gliales.

Matériel et méthodes

I. Matériel utilisé

1. Echantillons tissulaires

Les échantillons tissulaires ont été obtenus après exérèse par les neurochirurgiens du Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble suite au consentement écrit des patients ou de leur famille. Les échantillons nommés « contrôles » sont des extraits de cortectomies de patients épileptiques, c'est-à-dire considérés comme échantillons « non tumoraux ». Les échantillons tumoraux sont soit des méningiomes, soit des glioblastomes, soit des tumeurs oligodendrogiales (oligodendrogliomes et oligoastrocytomes) (Annexe 1). Pour ces trois types tumoraux, le caractère tumoral est établi par les anatomopathologistes selon la dernière classification de l'OMS des tumeurs du système nerveux central (Louis *et al.*, 2007). Concernant les glioblastomes et tumeurs oligodendrogiales, le caractère tumoral et l'appréciation du type tumoral sont également établis selon la classification du centre hospitalier Sainte-Anne (Daumas-Duport *et al.*, 2000). Les grades (A ou B) des tumeurs oligodendrogiales sont également déterminés selon cette classification. Deux des tumeurs oligodendrogiales sont de grade B, l'échantillon 1 car on observe une prise de contraste à l'IRM et l'échantillon 12 car des noyaux endothéliaux jointifs sont observés sur les coupes histologiques. Pour les méningiomes, l'invasion ou non des tissus adjacents par le méningiome opéré est appréciée d'une part par le neurochirurgien lors de l'exérèse mais également par analyse des images obtenues par IRM et CT-scanner. Les échantillons sont congelés à -80°C immédiatement après l'exérèse et conservés en banque au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Grenoble.

Dans le cas des gliomes (Annexe 1), les échantillons 1 à 4 sont classés comme oligodendrogliomes et les échantillons 5 à 10 comme glioblastomes. Les autres gliomes ont un statut plus difficile à préciser et l'approche de la classification histopathologique reste subjective et peut être associée à une grande variabilité selon l'expérimentateur établissant le diagnostic. Nous avons donc utilisé deux approches moléculaires publiées ces dernières années pour confirmer le diagnostic anatomopathologique de ces échantillons (cf II-5a).

- Milieu de culture pour cellules adhérentes

- DMEM 4.5g/L de glucose
- 10% SVF
- 100U de pénicilline et 100mg/ml de streptomycine

2. Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires de glioblastome U87 et d'adénocarcinome du sein MCF7 ont été obtenues de l'ATCC (respectivement HTB-14 et HTB-22). Ces cellules, adhérentes, sont cultivées en milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (Gibco) complété avec 10% de sérum de veau fœtal SVF (Gibco), de 100 U/mL de pénicilline et 100mg/ml de streptomycine (Gibco). La culture est réalisée en incubateur à 37°C et à 5% de CO₂. Dans les conditions normoxiques, les cellules U87 sont cultivées en présence de 20% d'O₂ alors que dans les conditions d'hypoxie, les cellules sont cultivées en présence de 0,3% d'O₂ en incubateur ou sous hotte « hypoxie » respectivement. Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont rincées au PBS, puis traitées à la trypsine (Trypsine-EDTA 0,25%, Gibco) pendant 2 minutes à 37°C puis sont réensemencées au 1/10^{ème}.



3. Cultures primaires de méningiomes

Les cultures primaires de méningiomes sont réalisées par excision, en plusieurs fragments de quelques mm³, d'un échantillon de méningiome opéré extemporanément au bloc opératoire, et ce dans le milieu de culture pour cellules adhérentes.

II. Méthodes

1. Caractérisation par immunofluorescence des cultures primaires de méningiomes

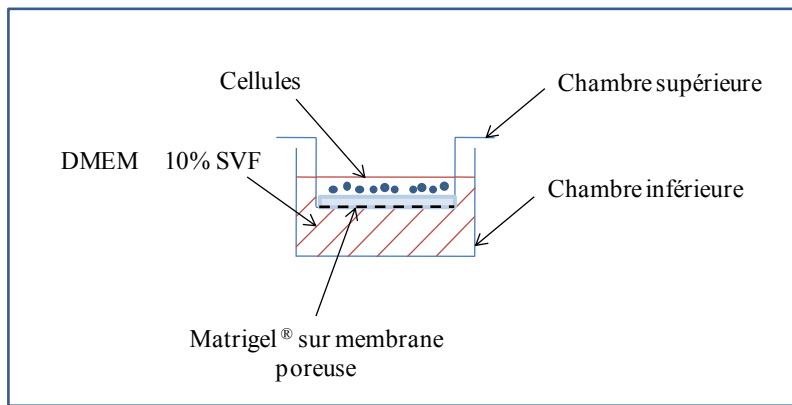
Les cellules tumorales de méningiomes peuvent être caractérisées par la présence de l'antigène épithélial de membrane (EMA) et de la Vimentine, marqueurs spécifiques mis en évidence par immunofluorescence. Les cellules sont cultivées sur lamelle de verre dans le

milieu de culture pour cellules adhérentes. Lorsque les cellules sont à environ 70% de confluence, les lamelles sont récupérées puis lavées au PBS trois fois pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite fixées au paraformaldéhyde 4%, glutaraldéhyde 0,1%, (+ triton-X-100 0,5% pour le marquage de la vimentine) à température ambiante pendant 10 minutes puis rincées trois fois 5 minutes au PBS (+ triton-X-100 0.5% (PBS-t) pour le marquage de la vimentine). Les cellules sont lavées au NaBH₄ (1mg/mL) deux fois 10 minutes, pour réduire les fonctions aldéhydes et empêcher une fixation non spécifique des anticorps. Après un rinçage au PBS ou PBS-t, les cellules sont incubées 20 minutes à température ambiante dans une solution de PBS (ou PBSt)-BSA 0,1%. Après trois lavages de 5 minutes au PBS ou PBSt, les cellules sont incubées 1 heure à température ambiante en présence de l'anticorps primaire anti-EMA (IgG de souris monoclonaux Mc5 Interchim[®]) ou anti-Vimentine (IgG de souris monoclonaux V9 Dako[®]) dilués respectivement au 1/5000 et 1/500 dans du PBS (ou PBSt)-BSA 0,1%. Les cellules sont ensuite lavées de nouveau trois fois 5 minutes au PBS puis incubées 1 heure à température ambiante avec l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 (anticorps de chèvre polyclonal A11029 Molecular Probes[®]) dilué au 1/1000 dans du PBS-BSA 0,1%. Dans cette solution est ajouté du Hoechst 33258 (Sigma[®]) dilué au 1/5000 pour le marquage de l'ADN. Les cellules, après trois lavages de 5 minutes au PBS, sont montées sur lame avec du milieu de montage Fluorsave (Calbiochem[®]) et observées au microscope à fluorescence inversé Axiovert 200M (Zeiss[®]). Les images sont obtenues avec l'objectif x40 à sec (Olympus[®]) grâce à une caméra Coolsnap HQ (Roper scientific[®]) et au logiciel Metamorph.

2. Test phénotypiques d'invasion des cellules

a. Chambres de Boyden

Une des méthodes les plus décrites pour observer les propriétés invasives des cellules en culture est l'utilisation de chambres de Boyden. Ce système est constitué de deux compartiments (chambre supérieure et inférieure) séparés par une membrane poreuse en polyéthylène (taille des pores de 8µm) que l'on recouvre d'une couche de Matrigel™ Basement membrane matrix (BD biosciences), extrait biologique mimant une matrice extracellulaire (Figure 24).



50µl de Matrigel à différentes concentrations (dilution 1/10, 1/20, 1/40 d'une solution à 10mg/ml) sont déposés dans les chambres supérieures puis les chambres de Boyden (Corning Transwell®) sont placées soit 4h à 37°C soit une nuit à température ambiante. 5.10⁴ cellules sont ensuite déposées dans les chambres supérieures en s'assurant de ne pas toucher la couche de Matrigel et les chambres inférieures sont remplies de 600µl de milieu DMEM (contenant 10% de SVF jouant le rôle de chimioattractant). Les chambres de Boyden sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C. Après 24 heures, la surface supérieure des membranes est nettoyée avec un coton-tige pour enlever le Matrigel et les cellules n'ayant pas traversé la membrane poreuse. 60µl de MTT (Sigma®) sont ensuite ajoutés dans les chambres inférieures puis les chambres de Boyden sont placées à 37°C pendant 4 heures. Les cellules adhérentes à la face inférieure de la membrane ainsi colorées sont ensuite observées au microscope (objectif x10) et photographiées. Une mesure quantitative colorimétrique peut être aussi réalisée par solubilisation des cristaux des dérivés de MTT intracellulaires dans 600µl de DMSO et mesure de densité optique effectuée à 570 nm.

Une gamme étalon permet d'attribuer un nombre de cellules à la densité optique mesurée. Alors que le pourcentage de migration est calculé comme étant le nombre de cellules présentes sur la face inférieure de la membrane rapporté au nombre de cellules déposées dans chaque puits, le pourcentage d'invasion est calculé comme le nombre de cellules présentes sur la face inférieure d'une membrane « coatée » au Matrigel rapporté au nombre de cellules présentes sur la face inférieure d'une membrane « non coatée ».

$$\% \text{ de migration} = \frac{\text{nombre de cellules ayant traversé la membrane "non coatée"}}{\text{nombre de cellules initialement présentes dans le puits}}$$

$$\% \text{ d'invasion} = \frac{\text{nombre de cellules ayant traversé la membrane "coatée"}}{\text{nombre de cellules ayant traversé la membrane "non coatée"}}$$

b. Système de mesure d'impédance

Le système xCelligence RTCA DP (Roche®), basé sur la mesure d'impédance cellulaire, permet de suivre en temps réel et en continu l'adhésion et la prolifération des cellules sur plaque E-plate 16 ou la migration et l'invasion des cellules sur plaque « CIM-plate 16 » (Cell Invasion and Migration). Les plaques E-plate 16 sont des plaques de 16 puits présentant des électrodes d'or en fond de puits et les plaques CIM-plate 16, de 16 puits également, sont comme les chambres de Boyden, constituées d'une chambre inférieure et d'une chambre supérieure présentant en son fond une membrane poreuse sous laquelle sont disposées les électrodes d'or.

Les électrodes d'or permettent de mesurer l'impédance cellulaire qui varie selon le nombre, la morphologie ainsi que l'adhésion des cellules.

- Evaluation sur E-plate du nombre optimal de cellules à incuber par puits

Trois quantités de cellules ont été testées par type cellulaire (méningiome invasif et non invasif) sur plaque E-plate 16 pour déterminer le nombre optimal de cellules, en terme de confluence, à utiliser par la suite sur plaque CIM-plate 16.

50µl de milieu DMEM + 10% SVF sont placés dans les puits des plaques E-plate 16 puis celles-ci sont placées dans l'analyseur du système xCelligence RTCA DP, lui-même placé dans l'incubateur à 37°C. La mesure du bruit de fond est ainsi réalisée pendant 1 minute. 200µl de milieu DMEM + 10% SVF seul ou comprenant les cellules sont ensuite ajoutés dans les puits (5000, 10000 et 20000 cellules) puis les mesures sont réalisées toutes les 5 minutes pendant 25 heures.

- Evaluation sur CIM-plate de la migration et de l'invasion cellulaire

Quatre dilutions de Matrigel (BD Biosciences) sont réalisées sur la glace avec du milieu DMEM froid sans SVF (1/3, 1/10, 1/20 et 1/40 à 10mg/ml) et 50µl de ces dilutions sont placés au centre des chambres supérieures des plaques CIM-plate pour les puits dédiés à l'étude de l'invasion cellulaire. Afin d'éviter la formation de ménisque, 50µl sont ôtés

immédiatement, et ce sans toucher la membrane. Les chambres supérieures sont ensuite placées à 37°C pendant 4 heures. Les chambres inférieures sont quant à elles remplies avec 160µl de milieu DMEM supplémenté ou non de SVF 10% puis sont assemblées aux chambres supérieures. Après avoir ensuite ajouté 30µl de DMEM sans SVF dans les chambres supérieures, l'ensemble est placé à 37°C pendant 1 heure pour équilibrer les membranes. Après cette incubation, les plaques sont placées dans l'analyseur du système xCelligence RTCA DP pour la mesure du bruit de fond pendant 1 minute.

Les cellules, à 60-80% de confluence, sont rincées au PBS puis traitées à la trypsine et reprises dans du milieu DMEM sans SVF à une concentration de 10^5 cellules/mL. 100µl de cette suspension (10000 cellules) sont placés dans les chambres supérieures puis les plaques sont laissées 30 minutes à température ambiante. Les plaques sont ensuite placées dans l'analyseur et les mesures d'impédance sont réalisées toutes les 15 minutes pendant 25 heures. Les analyses sont effectuées grâce au logiciel RTCA à partir duquel sont extraites les valeurs d'index cellulaire (IC) au cours du temps.

3. Extraction des acides nucléiques et protéines

a. Extraction des acides nucléiques

Cette extraction est réalisée sur coupes de tissus de 20µm (80mg et 25mg pour les extractions d'ARN et d'ADN respectivement) ou cellules (2.10^6 cellules lavées au PBS, traitées à la trypsine et récoltées par centrifugation à 1200 rpm). La lyse est effectuée avec les tampons de lyse des kits miRVana (Ambion®) et QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN®), respectivement pour les extractions d'ARN et d'ADN. Les ARN sont ensuite extraits selon les instructions du fournisseur par ajout de phénol-chloroforme, récupération de la phase aqueuse, ajout d'éthanol et passage sur colonne pour la séparation des ARN courts (taille inférieure à 250 nt) et des ARN longs (taille supérieure à 250 nt) (miRVana, Ambion®). Les ADN sont, quant à eux, extraits également selon les instructions du fournisseur sur colonne de silice après traitement protéinase et RNase A (QIAamp DNA Mini Kit, QIAGEN®).

Les deux types d'acides nucléiques, ARN et ADN, sont quantifiés à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific®) à 260nm et la qualité des ARN est vérifiée à l'aide du Bioanalyseur 2100 par électrophorèse miniature avec le kit RNA 6000 Nano Kit (Agilent®), technique présentée en annexe 2. Les ARN sont considérés comme non

dégradés pour des valeurs de l'indicateur RNA Integrity Number (RIN), données par le logiciel 2100 Expert Software, comprises entre 7,5 et 10.

b. Extraction des protéines

Les coupes de tissus de 20µm (environ 30mg) sont lysées avec le tampon Reporter Lysis Buffer 1X (Promega) supplémenté d'un cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche) à 4°C en vortexant toutes les 5min pendant 30min. Après centrifugation à 12000g pendant 10min, le surnageant est récupéré et les protéines dosées par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

4. Analyse de l'expression des ARNm par hybridation sur puce Affymetrix de type U133 Plus 2.0

a. Principe de la méthode

5µg d'ARN longs sont utilisés pour la synthèse du premier brin d'ADNc en présence d'amorce T7 oligo(dT) selon le protocole Genechip® Eukaryotic One-cycle target labeling kit (Affymetrix). Après synthèse du second brin, l'ADNc est purifié sur colonne puis une réaction de transcription *in vitro* est réalisée à 37°C pendant 16 heures, permettant l'amplification et le marquage à la biotine de l'ARNc. Les ARN amplifiés sont ensuite purifiés sur colonne puis quantifiés au Nanodrop ND1000. Environ 15µg d'ARN amplifiés sont ensuite fragmentés à 94°C pendant 35 minutes en présence d'ions Mg^{2+} et un contrôle qualité de la fragmentation est effectué par électrophorèse miniature à l'aide du Bioanalyseur 2100 (Agilent). Le produit de fragmentation biotinylé est ensuite hybridé sur puce Genechip® Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix). L'hybridation est ensuite effectuée à 45°C pendant 16 heures dans le four à hybridation puis le lavage de la puce a lieu dans la station de lavage. Les hybridations sont ensuite révélées par incubation avec la streptavidine couplée à la phycoérythrine. Plusieurs contrôles qualité sont ensuite générés par le logiciel Expression Control (Annexe 3), notamment concernant la qualité des ARN hybridés (vérifiée par comparaison des intensités obtenues pour des sondes situées en 5' et 3' d'un même ARN), l'hybridation correcte des ARNc (vérifiée par ajout d'ARNc contrôles avant hybridation), l'équivalence des valeurs de bruit de fond entre les différentes puces ou le nombre de sondes

(= probesets) détectées. Une fois cette étape effectuée, il est alors possible d'utiliser les valeurs brutes obtenues.

b. Normalisation et analyse des résultats

La première étape de l'analyse de ces valeurs brutes est la normalisation des données par rapport au bruit de fond. Cela est effectué par l'algorithme RMA (Robust Multi-array Average) qui permet une normalisation des données par la méthode quantile (Irizarry et al, 2003). Il est ensuite nécessaire d'annoter les sondes avec les noms des gènes correspondant grâce à l'outil NetAffx (<http://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/index.affx>).

Les données Affymetrix obtenues sont traitées avec le logiciel MeV (MultiExperiment viewer, <http://www.tm4.org/mev/>) pour le calcul des *p-values* par le test non paramétrique de Mann-Whitney et la création de regroupements hiérarchiques non supervisés.

5. Caractérisation moléculaire des glioblastomes et oligodendrogliomes

a. Classification par analyse sur puce Affymetrix de type U133 Plus 2.0

Deux analyses moléculaires à grande échelle ont été menées par différentes équipes pour distinguer différents types de gliomes par la recherche d'ARNm marqueurs de ces tumeurs, et ce par la technique d'hybridation sur puces Affymetrix.

La première étude à laquelle nous nous sommes intéressés a été menée sur 256 échantillons (provenant de l'UCSF et MDA) par Phillips qui distingue plusieurs groupes de gliomes dont les gliomes « mésenchymateux » et « proneuraux » (Phillips *et al.*, 2006). Ils ont identifié 30 sondes, présentes sur puces Affymetrix de type U133A ; 15 d'entre elles étant les marqueurs les plus probants du groupe des gliomes « proneuraux » et 15 autres des gliomes « mésenchymateux ». Les valeurs d'intensité des marqueurs identifiant le groupe proneural (PN) sont supérieures à 3 fois les intensités moyennes mesurées pour le groupe mésenchymateux (MES). De la même manière, les valeurs d'intensité des marqueurs

identifiant le groupe mésenchymateux (MES) sont supérieures à 3 fois les intensités moyennes mesurées pour le groupe proneural (PN) (Tableau 2).

La deuxième étude, menée par Li sur 159 échantillons (provenant de l'Hôpital Henry Ford, Detroit), distingue 2 groupes principaux, l'un nommé O comprenant la plupart des oligodendrogliomes et des astrocytomes de grade peu élevé (96%) et l'autre nommé G comprenant pour la majorité des glioblastomes (68%) (Li *et al.*, 2009). Dans cette étude, les auteurs décrivent une méthode basée sur la recherche de sondes présentes sur puce Affymetrix de type U133 Plus 2.0, permettant principalement de distinguer ces deux groupes. Les auteurs ont décrit 54 sondes comme nécessaires et suffisantes pour classer les échantillons dans un groupe ou l'autre (Tableau 3).

Dans notre étude, ayant utilisé les puces « nouvelle génération » Affymetrix de type U133 Plus 2.0, nous nous sommes assurés dans un premier temps que les sondes présentes sur ces puces sont identiques à celles présentes sur puces Affymetrix de type U133A, utilisées par Phillips et ses collègues pour leur classification de gliomes. Pour cela, nous avons utilisé la base de données Adapt (<http://bioinformatics.picr.man.ac.uk/adapt/Welcome.adapt>), regroupant un grand nombre d'informations concernant les sondes, notamment les transcrits ciblés par ces sondes.

Pour le classement de nos échantillons, les échantillons 1 à 4 (considérés comme tumeurs oligodendrogliales par l'anatomopathologiste) sont classés dans le groupe des gliomes « proneuraux » (PN) ou dans le groupe O décrits respectivement par Phillips et par Li. Les échantillons 5 à 10 (considérés comme des glioblastomes par l'anatomopathologiste) sont quant à eux classés dans le groupe des gliomes « mésenchymateux » (MES) ou dans le groupe G. Nous avons vérifié par la suite que les différentes sondes décrites soit par Phillips soit par Li sont bien des marqueurs intéressants pour classer ces échantillons tumoraux. Pour cela, nous avons effectué le test non paramétrique de Mann-Whitney sur les groupes d'échantillons indépendants (groupe 1 contenant les échantillons 1 à 4 et groupe 2 contenant les échantillons 5 à 10) grâce au logiciel MeV (Multiexperiment Viewer, <http://www.tm4.org/mev/>).

Tableau 2 : Liste des marqueurs des groupes de gliomes « proneuraux » (PN) et « mésenchymateux » (MES)
(Selon Phillips *et al.*, 2006)

Sondes PN	Gène	Moyenne "proneuraux" (PN)	Ratio PN/ MES	Sondes MES	Gène	Moyenne "mésenchymateux" (MES)	Ratio MES/ PN
209981_at	PIPPIN	407,90	6,97	205266_at	LIF	1072,09	8,49
207723_s_at	KLRC3	488,94	5,65	235417_at	FLJ25348	3004,08	5,60
227984_at	SRRM2	7861,76	5,33	223333_s_at	ANGPTL4	1062,63	4,90
219537_x_at	DLL3	1582,43	5,31	205547_s_at	TAGLN	3440,03	4,26
218796_at	C20orf42	1140,13	5,03	202628_s_at	SERPINE1	1192,86	4,22
243779_at	GALNT13	1260,88	4,51	201058_s_at	MYL9	587,83	4,02
214952_at	NCAM1	471,63	4,39	211966_at	COL4A2	1502,32	3,72
206850_at	RRP22	1061,57	3,85	226658_at	T1A-2	2785,82	3,63
204953_at	SNAP91	702,78	3,84	211981_at	COL4A1	1698,52	3,50
214279_s_at	NDRG2	4127,71	3,72	229438_at	FAM20C	659,24	3,46
226913_s_at	SOX8	12487,10	3,71	201666_at	TIMP1	10742,96	3,40
232833_at	dA201G10.1	972,68	3,48	209396_s_at	CHI3L1	15372,82	3,36
214762_at	ATP6V1G2	1123,77	3,44	215870_s_at	PLA2G5	1236,25	3,33
203146_s_at	GABBR1	2693,87	3,41	211564_s_at	RIL	832,42	3,28
219196_at	SCG3	1245,88	3,38	218880_at	FOSL2	405,07	3,05

Tableau 3 : Liste des sondes permettant de distinguer les groupes O et G. Les ratios O/G sont exprimés en \log_2 (Selon Li *et al.*, 2009)

Sonde	Gène	Ratio O/G	Sonde	Gène	Ratio O/G
202990_at	PYGL	-1,56	200916_at	TAGLN2	-2,75
200650_s_at	LDHA	-1,70	224917_at	MIRN21	-2,81
227295_at	IKIP	-1,84	225799_at	MGC4677	-2,82
226722_at	FAM20C	-1,90	218802_at	FLJ20647	-2,92
212169_at	FKBP9	-1,97	221577_x_at	GDF15	-2,98
217739_s_at	PBEF1	-2,00	205479_s_at	PLAU	-3,03
201505_at	LAMB1	-2,08	201012_at	ANXA1	-3,03
200600_at	MSN	-2,10	211964_at	COL4A2	-3,15
208636_at	ACTN1	-2,12	202627_s_at	SERPINE1	-3,20
202878_s_at	C1QR1	-2,13	202912_at	ADM	-3,25
200771_at	LAMC1	-2,14	218368_s_at	TNFRSF12A	-3,26
201590_x_at	ANXA2	-2,14	208394_x_at	ESM1	-3,35
215223_s_at	SOD2	-2,18	205572_at	ANGPT2	-3,40
223276_at	NID67	-2,20	206157_at	PTX3	-3,61
214762_at	ATP6V1G2	2,21	221898_at	PDPN	-3,91
229724_at	GABRB3	2,33	203729_at	EMP3	-4,90
210512_s_at	VEGF	-2,38	202718_at	IGFBP2	-5,09
212533_at	WEE1	-2,40	202237_at	NNMT	-5,25
221729_at	COL5A2	-2,45	201666_at	TIMP1	-6,29
203186_s_at	S100A4	-2,51	209395_at	CHI3L1	-6,47
213418_at	HSPA6	-2,51	213308_at	SHANK2	2,08
210095_s_at	IGFBP3	-2,53	227425_at	REPS2	2,14
211980_at	COL4A1	-2,54	203146_s_at	GABBR1	2,43
1569003_at	TMEM49	-2,56	232059_at	DSCAML1	2,59
208659_at	CLIC1	-2,61	231935_at	ARPP-21	2,65
209360_s_at	RUNX1	-2,63	207447_s_at	GNTIVH	3,68
208816_x_at	ANXA2P2	-2,71	204465_s_at	INA	3,99

- Classification de Phillips

Nous avons calculé notre référentiel des valeurs des ratios pour l'ensemble des 30 sondes sélectionnées par Phillips à l'aide des valeurs obtenues sur notre propre plate-forme Affymetrix. Nous avons ainsi déterminé les valeurs des ratios « moyenne PN/moyenne MES », pour les 15 sondes marqueurs des gliomes « proneuraux » (sondes PN), et celles des ratios « moyenne MES/ moyenne PN », pour les 15 sondes marqueurs des gliomes « mésenchymateux » (sondes MES) en utilisant les valeurs obtenues pour les groupes de tumeurs 1 et 2 décrits ci-dessus. Pour les échantillons utilisés dans l'étude, on calcule ensuite les valeurs des 15 ratios « valeur des sondes PN de l'échantillon/valeurs moyennes des sondes PN dans les tumeurs MES » (ratio 1) ainsi que « valeur des sondes MES de l'échantillon/valeurs moyennes des sondes MES dans les tumeurs PN » (ratio 2). Un coefficient de corrélation est ensuite calculé entre le ratio 1 et le ratio « moyenne PN/moyenne MES » (CC_{PN}) et un autre entre le ratio 2 et le ratio « moyenne MES/moyenne PN » (CC_{MES}). Sur cette base, les échantillons sont classés dans le groupe PN ou MES si la valeur absolue de la différence des coefficients de corrélation $|CC_{PN}-CC_{MES}|$ est supérieure à 20.

- Classification de Li

Les moyennes des valeurs d'intensité du groupe O et du groupe G, ainsi que les ratios « moyenne O/moyenne G » ont été calculés et ce pour chacune des 54 sondes décrites par Li. Chaque échantillon, y compris les échantillons 1 à 10, est ensuite considéré soit comme un oligodendrogliome et la valeur d'intensité de chaque sonde est comparée à la moyenne G soit inversement. Dans chacun des cas, les ratios « échantillon/moyenne G » et « moyenne O/échantillon » (en \log_2) sont comparés au ratio « moyenne O/moyenne G » pour chaque sonde et un coefficient de corrélation est mesuré pour chaque échantillon.

b. Analyse mutationnelle du gène codant pour IDH1

Une mutation dans le gène codant pour IDH1, au niveau du codon 132, a été mise en évidence comme marqueur de la plupart des oligodendrogliomes ou des glioblastomes secondaires mais très rarement des glioblastomes primaires (Ichimura *et al.*, 2009). Deux couples d'amorces ont été testés pour amplifier par PCR la région du codon 132 ; le premier ayant été décrit par Nobusawa (Nobusawa *et al.*, 2009) et le deuxième ayant été décrit par Bleeker (Bleeker *et al.*, 2009). Les amorces utilisées sont les suivantes :

- Nobusawa *et al.* :

Sens : 5'- CCA CTA TTA TCT CTG TCC TC - 3'

Antisens : 5'- GCTAGG CGA GGA GCTCCA GT - 3'

- Bleeker *et al.* :

Sens : 5'- AATGAGCTCTATATGCCATCACTG - 3'

Antisens : 5'- TTCATACCTTGCTTAATGGGTGT – 3'

Les produits PCR sont ensuite vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose. Seule l'amplification effectuée avec le couple d'amorce décrit par Bleeker et ses collègues fournit des résultats satisfaisants (bande unique visualisée sur gel d'agarose). Ce sont ces fragments PCR qui ont été produits puis confiés à la société Cogenics pour séquençage par la méthode de séquençage par terminaison de chaîne Sanger. L'amorce de séquençage est la suivante :

- Bleeker *et al.* : 5'- GCCATCACTGCAGTTGTAGGTTA – 3'

6. Analyse du taux d'expression des miARN

a. Par la méthode d'hybridation sur membranes « à façon »

Des oligonucléotides, d'environ 60 bases, spécifiques de 281 miARN matures (Ambion miRVana[™] miRNA Probe Set Oct 05) sont déposés sur des membranes de nylon (Amersham[®]) en répliquat grâce à un robot « arrayer GMS 417 » (MWG) puis fixés de manière covalente par illumination aux rayons UV. 2µg d'ARN courts sont ensuite marqués radioactivement par ajout d'une extension polyA. La réaction est réalisée en présence de [³³P]-α-ATP et de poly(A)polymérase pendant 1 heure à 35°C puis les ARN marqués sont hybridés sur les membranes de nylon. Après lavage des membranes dans du tampon SSC 5X-SDS 1%, les hybridations sont révélées par autoradiographie au moyen d'écrans phosphore photostimulables. Les intensités des spots obtenus sont quantifiées à l'aide du logiciel Array Gauge, attribuant une valeur brute à chaque signal radioactif. Le bruit de fond est ensuite soustrait et une correction inter-expériences est réalisée pour pallier les différences d'activité de la radioactivité, le temps d'exposition des membranes ou la sensibilité de l'écran entre les différentes expériences.

b. Par la méthode de PCR quantitative

Environ 80ng d'ARN courts sont convertis en ADN complémentaire par transcription inverse en présence d'un primer, en forme de boucle spécifique du miARN mature dosé, et selon le protocole fourni par Applied biosystems (TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription kit). Cette réaction de transcription inverse est réalisée selon le programme suivant : 30 minutes à 16°C, 30 minutes à 42°C et 5 minutes à 85°C. La PCR quantitative est ensuite réalisée sur le produit de transcription inverse en présence de TaqMan 2X PCR Master mix et du fluorophore FAM contenu dans le kit TaqMan miRNA assay (miRBase v12 – Septembre 2008). L'activation de l'enzyme se fait à 95°C pendant 10 minutes, puis 40 cycles de dénaturation (15 secondes à 95°C)/ hybridation-élongation (1 minute à 60°C) sont réalisés. L'ensemble de ces étapes ainsi que l'acquisition de fluorescence en fin d'étape d'élongation est effectué par l'appareil Stratagène Mx3005p.

Plusieurs contrôles endogènes sont également dosés de cette manière, tels que RNU6B, RNU24, RNU44, RNU19 et RNU66, petits ARN nucléaires ou nucléolaires.

Après acquisition des données, une valeur appelée Ct (Cycle Threshold), définie comme le nombre de cycles à partir duquel la fluorescence est supérieure au seuil du bruit de fond, est déterminée en utilisant les paramètres de base de l'appareil, et ce pour un miARN individuel dans un échantillon. Pour notre étude, souhaitant obtenir des ratios d'expression pour un même miARN entre les échantillons « contrôle » et les échantillons de glioblastomes ou d'oligodendrogliomes, ainsi qu'entre ces deux types d'échantillons, la quantification relative est suffisante. Pour cela, la formule simplifiée de calcul du ratio pour un miARN-X entre un échantillon A et un échantillon B est la suivante :

$$\text{Ratio A/B} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}} \text{ avec } \Delta\Delta\text{CT} = (\text{Ct}_{\text{miR-X}} - \text{Ct}_{\text{contrôle endogène}})_{\text{échantillon A}} - (\text{Ct}_{\text{miR-X}} - \text{Ct}_{\text{contrôle endogène}})_{\text{échantillon B}}$$

Le principe de cette méthode de dosage est présenté plus en détail en annexe 4.

Nous avons pu déterminer, grâce au logiciel Normfinder (<http://www.mdl.dk/publicationsnormfinder.htm>) que parmi RNU6B, RNU24, RNU44, RNU19 et RNU66, l'ARN nucléolaire RNU24 serait le meilleur gène normalisateur.

Les ratios ont ensuite été calculés avec le logiciel REST (<http://www.qiagen.com/Products/REST2009Software.aspx?r=8042>).

c. Par la méthode d'hybridation sur puces Affymetrix de type miRNA Genechip[®]

- Marquage des ARN courts

100ng d'ARN courts sont marqués grâce au FlashTag[™] Biotin HSR labeling kit (Genisphere) qui consiste en une étape de polyadénylation des ARN en 3' et en une étape de ligature avec un oligonucléotide possédant un dendrimère 3DNA[®] en son extrémité, dendrimère marqué avec 15 biotines (Annexe 5). Cette architecture de 15 biotines par dendrimère est utilisée pour intensifier le signal. Au cours de cette réaction de marquage sont inclus dans chaque échantillon, des contrôles spécifiques permettant de vérifier que les deux étapes clés de ce marquage ont bien été réalisées.

- Contrôle qualité de la réaction de marquage

Lors de la réaction de marquage, un ARN contrôle appelé « RNA Spike Control Oligos » est inclus dans chaque échantillon pour permettre par la suite d'effectuer un contrôle qualité de cette réaction de biotinylation, contrôle appelé test ELOSA (Enzyme Linked OligoSorbent Assay). Il s'agit d'un test colorimétrique mettant en évidence l'hybridation entre l'ARN contrôle biotinylé et des oligonucleotides préalablement immobilisés sur plaque Flat Bottom Immobilizer™ Amino (Nunc).

Cette immobilisation a lieu à 4°C pendant 12 heures et les plaques sont ensuite lavées au PBS puis saturées à la BSA pendant 1 heure à température ambiante. 2µL des 23,5µL de la réaction de marquage sont ensuite mélangés au sulfate de dextran 25%, SSC 5X, et SDS 0,05% et l'ensemble est hybridé sur plaque ELOSA par incubation à température ambiante pendant 1 heure. L'ajout de streptavidine associée à l'enzyme peroxydase (HRP = horseradish peroxidase) et ensuite de substrat TMB (3,3',5,5'- tétraméthylbenzidine) permet enfin de révéler la qualité du marquage. Après incubation 15 minutes à l'abri de la lumière, une coloration bleue indique un marquage de bonne qualité. Ce marquage peut également être quantifié par ajout de solution Stop et par mesure de la DO à 450nm. On considère que le marquage est suffisant pour que les ARN marqués soient hybridés si la DO est supérieure à 0,2.

- Hybridation sur puce miRNA Genechip®

Le cocktail d'hybridation est ensuite préparé avec le reste de la réaction de biotinylation et incubé pendant 5 minutes à 99°C suivies de 5 minutes à 45°C. Ce cocktail est enfin injecté dans la puce de type miRNA Genechip® (Affymetrix), puce qui est ensuite incubée pendant 16 heures à 48°C dans un four à hybridation. La puce est placée après hybridation dans la station de lavage pour être lavée avec deux types de solutions de lavage Wash A et Wash B. Après l'étape de lavage, les signaux d'hybridation sont révélés par ajout de streptavidine couplée à la phycoérythrine puis par lecture de la puce par le scanner.

- Contrôle qualité et normalisation

Tout comme pour les puces de type U133 Plus 2.0, plusieurs contrôles qualité sont générés (à l'aide du logiciel miRNA QC tool) comme la qualité des ARN hybridés, l'hybridation correcte des ARNc, l'équivalence des valeurs de bruit de fond entre les différentes puces ou le nombre de sondes (= probesets) détectées. Une fois cette étape effectuée, il est alors possible d'utiliser les valeurs brutes obtenues.

L'annotation des sondes est possible par association avec une librairie Affymetrix et les données brutes sont ensuite normalisées selon les recommandations de Genisphere par une normalisation quantile après suppression du bruit de fond. Ces puces permettent de doser l'expression de miARN de 71 espèces différentes et notamment de 847 miARN humains (selon la version v1.1 de la base de données miRBase, Avril 2008).

7. Analyse d'altérations génétiques par PCR génomique et séquençage

La région d'intérêt à amplifier, correspondant à la région génomique de plusieurs milliers de paires de bases entourant la séquence du miARN, est située à l'aide de Map Viewer (www.ncbi.nih.gov/mapview/map_search.cgi). Les amorces sont ensuite choisies avec le logiciel Clone Manager de manière à obtenir des amplicons de taille entre 300 et 600 paires de bases et des T_m proches. La liste des amorces, la taille des amplicons et les températures d'hybridation sont présentées en annexe 6.

La réaction de PCR est réalisée sur 25 ng d'ADN selon le programme suivant dans un thermocycleur : une étape de dénaturation et activation de la polymérase à 92°C pendant 5 minutes puis 28 cycles de dénaturation 30 secondes à 95°C, d'hybridation 30 secondes à la température d'hybridation et d'élongation 30 secondes à 72°C, et enfin une étape d'élongation finale à 72°C pendant 5 minutes.

La qualité et la quantité des produits amplifiés sont ensuite déterminées par électrophorèse sur gel d'agarose puis ces produits sont séquencés par la société Cogenics.

8. Etude de méthylation des promoteurs des miARN

500ng d'ADN extraits sont tout d'abord traités au bisulfite de sodium selon le kit EZ-DNA Methylation-Gold™ (Zymo Research) de manière à convertir les cytosines non méthylées en uracile (Frommer, 1992). Cette réaction de conversion est réalisée dans un premier temps selon le protocole du fournisseur dans un thermocycleur selon le programme suivant : 10 minutes à 98°C puis 2h30 à 64°C. Lors de cette première étape se produit une sulfonation et une désamination transformant les cytosines non méthylées en uracile sulfonates. Une étape de désulfonation sur colonne est ensuite réalisée pour convertir les uracile sulfonates en uracile. L'ADN converti est ensuite élué et dosé au Nanodrop ND1000 à 260nm en utilisant le facteur de corrélation utilisé pour l'ARN, soit 40ng/μL pour une absorbance de 1.

La méthylation ne concerne que les cytosines précédées d'une guanine, c'est à dire celles présentes dans les motifs CpG, motifs fortement présents dans les régions promotrices. Marson et ses collègues ont fait état de la localisation des sites de départ de transcription (TSS) des gènes codant les miARN (Marson *et al.*, 2008). Nous avons déterminé *in silico* si des îlots CpG sont présents dans une région d'environ 2 kb en amont de ces sites grâce au logiciel Methylprimer Express® Software v1.0 (Applied Biosystems). Lorsque des îlots CpG sont effectivement présents dans les régions promotrices des gènes codant pour les miARN d'intérêt, les amorces pour la PCR et le séquençage sont dessinés avec le logiciel PSQ Assay Design (QIAGEN). Le choix se porte sur des amorces ayant des températures d'hybridation différentes de moins de 2°C et une des deux amorces de PCR doit être biotinylée pour la purification par la suite des brins amplifiés biotinylés.

Les amorces de PCR pour l'étude de méthylation des promoteurs présentant un îlot CpG sont présentées en annexe 7, ainsi que les tailles des amplicons, les concentrations de MgCl₂ et les températures d'hybridation et; ces deux derniers paramètres ayant été optimisés, ils sont donc spécifiques pour chaque réaction de PCR. La réaction de PCR est réalisée sur 50ng d'ADN traité au bisulfite de sodium et purifié selon le programme suivant dans un thermocycleur : une étape de dénaturation de la matrice et activation de la polymérase à 95°C pendant 4 minutes puis 35 cycles de dénaturation 30 secondes à 95°C, d'hybridation 30 secondes à la température d'hybridation et d'élongation 45 secondes à 72°C, et enfin une étape d'élongation finale à 72°C pendant 7 minutes.

Après vérification de la qualité et de la spécificité de l'amplification par électrophorèse sur gel d'agarose, les brins biotinylés sont immobilisés sur billes de Sepharose couplées à la streptavidine (Amersham Biosciences). Les suspensions sont aspirées à l'aide du Vacuum Prep tool (QIAGEN) puis les billes retenues sont lavées à l'éthanol 70% puis avec une solution de lavage. Les brins d'ADN ainsi purifiés sur billes sont ensuite dénaturés à l'aide d'une solution NaOH 0,2M, resuspendus dans une solution tampon comprenant l'amorce de séquençage (Annexe 7). L'hybridation est ensuite réalisée à 80 °C pendant 2 minutes.

La méthode de pyroséquençage est basée sur une suite de réactions enzymatiques entraînant une émission de lumière lors de l'incorporation des nucléotides (Colella *et al.*, 2003; Tost *et al.*, 2003). Le principe est présenté en annexe 8. La réaction est réalisée sur le pyroséquenceur PSQ 96 Systems (QIAGEN) en utilisant le kit PyroMark Gold Q96 SQA (QIAGEN) contenant les enzymes, substrats et nucléotides nécessaires au séquençage.

Cette technique permettant de séquencer environ 50-60 nucléotides, l'analyse de méthylation est réalisée sur environ 5 cytosines par région promotrice étudiée.

Les données sont analysées avec le logiciel Pyro Q-CpG software (QIAGEN). Pour chaque région promotrice étudiée (8 au total dont 2 pour mir-339), les résultats obtenus après pyroséquençage se présentent sous forme de taux de méthylation exprimés en pourcentage pour chaque position CpG. Nous avons donc calculé dans un premier temps pour chaque région promotrice les moyennes des taux de chaque position puis dans un second temps la moyenne pour l'ensemble des échantillons de chaque groupe (glioblastomes, oligodendrogliomes et tissus normaux).

9. Recherche *in silico* des ARNm cibles

Comme présenté en introduction, il existe plusieurs outils bioinformatiques mis à disposition gratuitement sur Internet pour la recherche des ARNm cibles des miARN. Les outils les plus utilisés actuellement sont Targetscan, miRanda, PicTar et Microcosm targets; c'est pourquoi pour notre étude, nous avons utilisé à la fois Microcosm targets (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>) et TargetCombo qui compile les résultats de Targetscan, miRanda et PicTar (<http://diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/TargetCombo.cgi>).

- Tampon Laemmli

- 20mM Tris-HCl pH 7,6

- 10% glycérol

- 5% β -mercaptoethanol

- 63mM Tris-HCl pH 6,8

- Traces de bleu de bromocrôm

10. Western-blot

- Tampon de transfert

- 12,5mM Tris-HCl

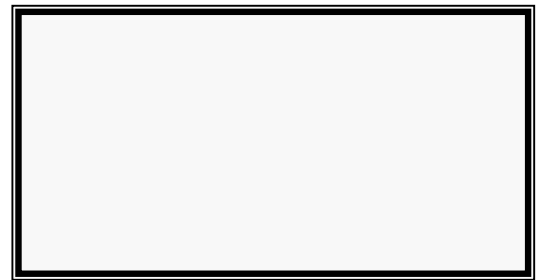
- 96mM glycine

- 0,05% SDS (p/v)

- 20% éthanol absolu

Matériel et méthodes

Environ 20 μ g d'échantillon sont dilués dans du tampon Laemmli (Laemmli, 1970) puis chauffés à 100°C pendant 10 minutes avant d'être déposés sur un gel de polyacrylamide. La migration s'effectue à voltage constant 10 minutes à 90V puis à 140V dans du tampon de migration (Biorad). Après migration, les protéines sont transférées sur membrane PVDF (Millipore), immergée préalablement 10 secondes dans de l'éthanol pur puis 30 minutes dans le tampon de transfert. Le transfert est ensuite réalisé à ampérage constant à 200mA pendant 90 minutes dans le tampon de transfert. La membrane est plongée par la suite dans une solution de rouge ponceau pour vérifier le bon déroulement du transfert puis lavée à l'eau. Après lavage, la membrane est saturée dans une solution de lait dilué à 10% dans du TBS-Tween20 0,1% (TBS-T) pendant 30 minutes à température ambiante.



L'anticorps primaire (Tableau 4) est dilué dans du lait 2%/TBS-T (les dilutions utilisées pour chaque anticorps sont présentées dans le tableau X) et la membrane est incubée dans cette solution une nuit sous agitation à 4°C. Trois lavages de 15 minutes chacun sont ensuite réalisés dans du TBS-T à température ambiante. La membrane est ensuite incubée 1 heure à température ambiante sous agitation dans la solution d'anticorps secondaire dilué dans le TBS-T. La membrane est de nouveau lavée trois fois dans du TBS-T. L'anticorps secondaire étant couplé à la HRP, la révélation est possible avec le kit de détection ECL

(Enhanced Chemiluminescence, Millipore). Le signal luminescent émis est révélé avec le Chemidoc XRS+ (Bio-Rad) et les signaux sont analysés avec le logiciel Image Lab (Bio-Rad). Une valeur d'intensité (en UA) est attribuée à chaque signal et les valeurs sont normalisées avec celles obtenues pour la beta actine.

Tableau 4 : Détails sur les différents anticorps primaires dosés en western-blot.

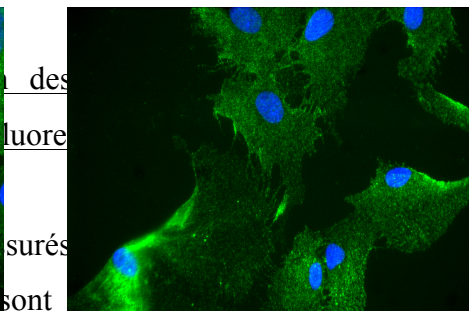
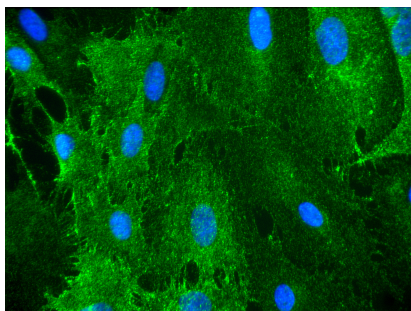
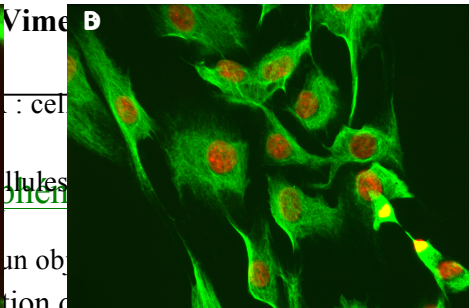
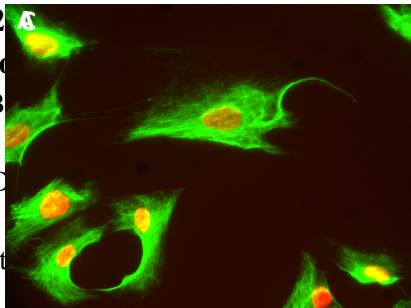
Anticorps primaire	Espèce	PM (kDa)	Dilution utilisée	Fournisseur	Référence
anti-β Actin	Lapin (p)	42	1/5000	Neomarkers	RB-9421
anti-Bcl2 (C-2)	Souris (m)	26	1/200	Santa Cruz	sc7382
anti-CCPG1 (X-21)	Lapin (p)	87	1/200	Santa Cruz	sc133446
anti-CD44	Lapin	82	1/200	Abcam	ab51037
anti-MDH1	Souris	36	1/200	Abcam	ab76616
anti-MDM2 (D-12)	Souris (m)	55	1/100	Santa Cruz	sc5304
anti-hnRNP I (SH54)	Souris (m)	57	1/200	Santa Cruz	sc56701
anti-SIRT1 (B-7)	Souris (m)	82	1/100	Santa Cruz	sc74465
anti-SNAP25 (4E11)	Souris (m)	23	1/400	Santa Cruz	sc81665
anti-STAT3 (F-2)	Souris (m)	90	1/200	Santa Cruz	sc8019
anti-THBS1 (A4.1)	Souris (m)	129	1/200	Santa Cruz	sc59886

11. Rationalisation des données et mise en évidence de nouvelles voies moléculaires

Les résultats concernant les miARN marqueurs des gliomes et leurs cibles décrites dans la littérature peuvent être rationalisés de manière à mettre en évidence des voies moléculaires impliquées dans le développement des tumeurs gliales. Pour cela, nous avons utilisé le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

Résultats

Figure 25
 En A et B
 en rouge
 En C et D
 bleu
 L'acquisition



es primaires de

Résultats

(invasives) et l'ADN

(invasives); et l'ADN en

méningiomes

des

fluore

surés

sont

EMA et la Vimentine par

es cellules qui prolifèrent

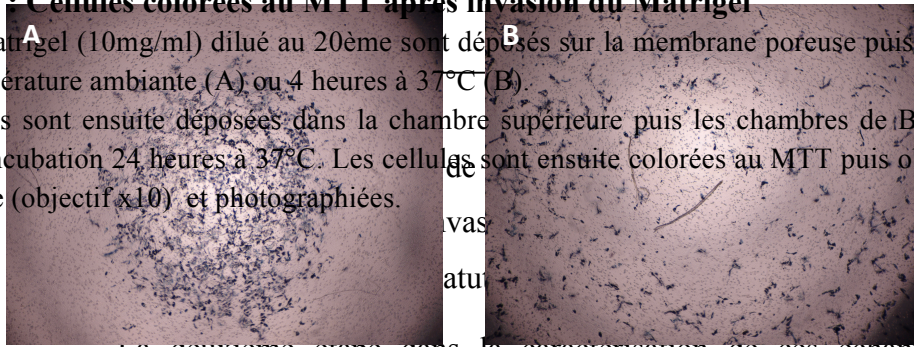
et ce par détection par

immunofluorescence des marqueurs Vimentine et EMA. Un co-marquage, initialement pensé, a été impossible du fait de la localisation de chacune de ces protéines, dans le cytoplasme pour la vimentine et à la surface membranaire pour l'EMA. Sur la figure 25 sont donc présentés les marquages individuels de ces deux protéines pour des cellules primaires issues de méningiomes invasifs et non invasifs.

Figure 26 : Cellules colorées au MTT après invasion du Matrigel

50µl de Matrigel (10mg/ml) dilué au 20ème sont déposés sur la membrane poreuse puis séchés une nuit à température ambiante (A) ou 4 heures à 37°C (B).

Les cellules sont ensuite déposées dans la chambre supérieure puis les chambres de Boyden sont mises en incubation 24 heures à 37°C. Les cellules sont ensuite colorées au MTT puis observées au microscope (objectif x10) et photographiées.



Résultats

La deuxième étape dans la caractérisation de ces échantillons tumoraux est la confirmation du phénotype d'invasion de chaque échantillon. Pour cela, les cellules issues de méningiomes invasifs et non invasifs ont été soumises à deux tests phénotypiques *in vitro*.

2. Tests phénotypiques d'invasion

a. Chambres de Boyden

La formation d'un ménisque lors de l'ajout de la couche de Matrigel est souvent observée et peut être critique pour une observation correcte de l'invasion. Nous avons donc testé deux conditions de séchage du Matrigel, 4 heures à 37°C et une nuit à température ambiante. Après coloration des cellules fixées sous les membranes poreuses en présence de MTT, nous avons photographié les membranes (Figure 26).

On observe, seulement pour la condition de séchage à température ambiante pendant une nuit, un regroupement cellulaire au centre de la membrane, mettant en évidence la formation d'un ménisque, l'invasion préférentielle par le centre et donc la possibilité de gêner

Figure 28 : Profils des index cellulaires normalisés en fonction du temps obtenus sur E-plate 16

Tracés bleu et violet : 5000 cellules (Bleu : *non invasives* ; Violet : *invasives*)

Tracés verts : 10000 cellules (Vert foncé : *non invasives* ; Vert clair : *invasives*)

Tracés rouge et rose : 20000 cellules (Rouge : *non invasives* ; Rose : *invasives*)

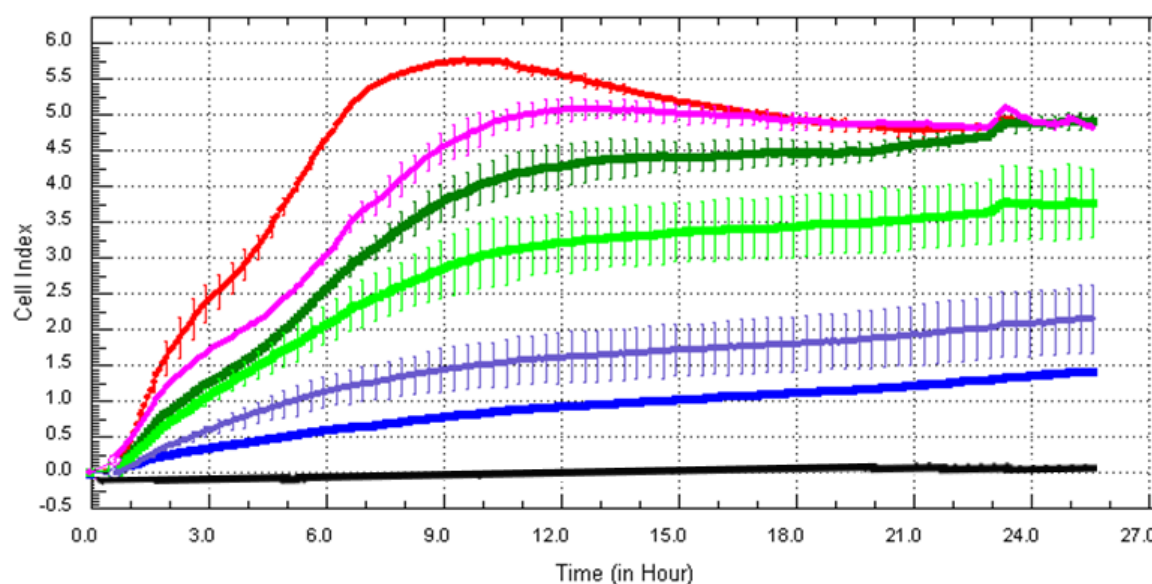
Tracé noir : Contrôle négatif

On remarque cependant que seules les dilutions 1/20 et 1/40 permettent de distinguer l'invasion des deux types cellulaires alors que la dilution 1/10 n'est pas adaptée pour ce test phénotypique.

Concernant le comptage des cellules ayant traversé la membrane poreuse, plusieurs méthodes ont été décrites comme la coloration des cellules et le comptage manuel au microscope mais nous avons choisi le test MTT plus fiable et moins contraignant. Cependant, nous avons eu l'opportunité de tester le système xCelligence RTCA DP (Roche®), qui permet une mesure d'impédance en temps réel et en continu mais qui a également l'avantage de ne pas nécessiter de marquage et donc de garder les cellules en condition native.

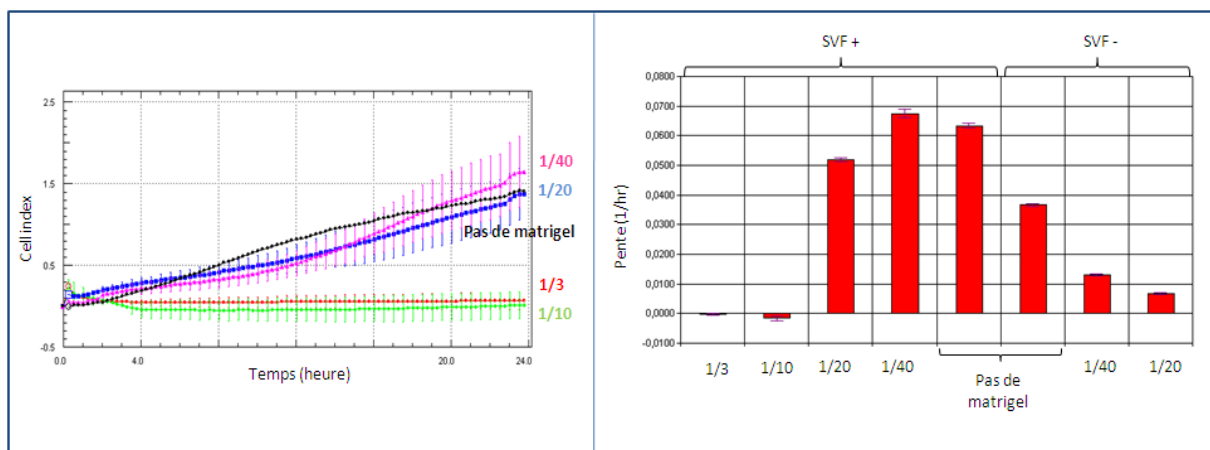
b. Système de mesure d'impédance

Trois quantités cellulaires (5000, 10000 et 20000 cellules) ont été testées sur plaque E-plate 16 pour déterminer le nombre optimal de cellules à utiliser par la suite pour le test d'invasion sur CIM-plate 16. Les index cellulaires ont été mesurés au cours du temps à la fois pour les cellules invasives et non invasives (Figure 28).

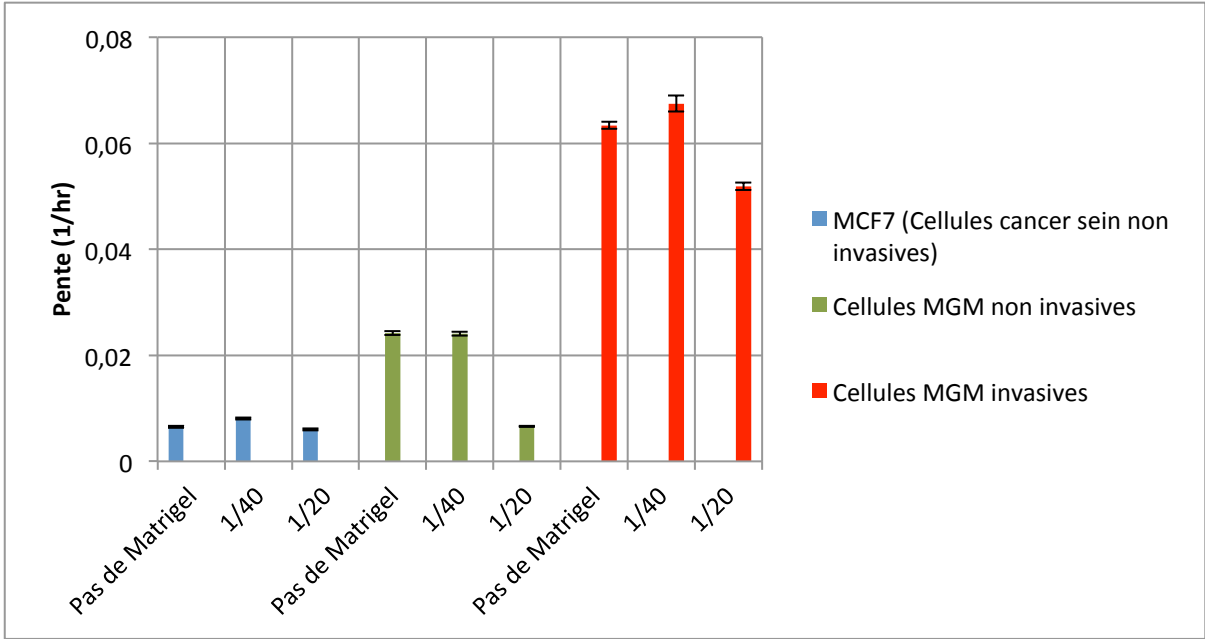


L'impédance cellulaire mesurée dépend à la fois du nombre de cellules ayant adhéré sur les électrodes d'or mais également de la capacité d'adhésion et de la morphologie, notamment de la taille des cellules. Pour la condition de 20000 cellules, une diminution de l'index cellulaire est observée après 10-12 heures d'incubation indiquant une rétraction possible des cellules due à une confluence cellulaire trop importante. Concernant la condition de 5000 cellules, les index cellulaires indiquent bien une augmentation de la prolifération cellulaire mais ces valeurs d'index cellulaires étant relativement faibles, nous avons choisi comme condition optimale la condition de 10000 cellules.

L'invasion des cellules invasives a été testée sur quatre dilutions de Matrigel (1/3, 1/10, 1/20 et 1/40) en présence de SVF, jouant le rôle de chimioattractant (Figures 29 A et B). Sur la figure 29 A sont présentés les index cellulaires en fonction du temps et ces profils ne présentant pas de plateau tout au long des 24 heures d'incubation, il nous a été possible de présenter les résultats sous forme de pente pour chaque courbe (Figure 29 B). On remarque d'une part que les dilutions 1/3 et 1/10 ne permettent pas de laisser les cellules ayant une forte capacité invasive à dégrader le Matrigel et à passer la membrane poreuse puisque les index cellulaires sont proches du bruit de fond. Quant à la dilution 1/40, elle semble être également peu adaptée pour l'étude phénotypique sur cellules invasives puisque les index cellulaires sont proches de la condition sans Matrigel. Quant aux conditions sans chimioattractant, on observe comme attendu une diminution nette de l'invasion.



Si on compare la migration (pas de Matrigel) et l’invasion (dilutions 1/20 et 1/40) de cellules issues de méningiomes invasifs et de cellules non invasives issues de cancer du sein (MCF7) ou issues de méningiomes, on remarque une nette différence entre cellules invasives et non invasives (Figure 30). Le fait que la dilution 1/40 ne soit pas adaptée puisque trop proche de la condition « sans Matrigel » est également confirmée pour les cellules non invasives. On peut également observer que les cellules non invasives de méningiomes ont une capacité migratoire supérieure à celle des cellules non invasives MCF7.



II- Recherche de marqueurs du phénotype invasif des méningiomes

1. Recherche de biomarqueurs de type ARNm

Cette recherche menée par hybridation sur puces Affymetrix de type U133 Plus 2.0 a mis en évidence que 130 gènes sont exprimés différemment entre méningiomes invasifs et non invasifs. 90 gènes semblent être surexprimés dans les méningiomes invasifs (Ratio > 3 avec une p-value < 0,05 selon le test non paramétrique de Mann-Whitney) et 40 sous-exprimés dans ce type de méningiome en comparaison aux méningiomes non invasifs (Ratio < 0,3 avec une p-value < 0,05 selon le test non paramétrique de Mann-Whitney). Le regroupement hiérarchique des échantillons est présenté sur la figure 31.

ADAMTS1
ANGPTL4
APOBEC3
AQP3
AREG
ATF3
BAMBI
BCL2A1
BDKRB2
CCL2
CCL8
CD36
CH25H
CHST9
CLC
COCH
COL14A1
COL23A1
CPA3
CRISPLD2
CXCL1
CXCL2
CXCL3
CYP26B1
CYP3A5
CYP3A7
CYP4F3
D4S234E
DAPL1
DUSP2
DUSP5
EDIL3
ERBB3
FAM20A
FCN1
FGF1
FOSB
FOSL1
FOXQ1
GEM
GPC5
HAS1
HBEGF
HDC
IGF2BP2
IL12A
IL1RL1
IL1RN
IL6
IL8
INSC
ISG20
ITI1H2
KCNI14
KCNJ15
LIF
LRRC31
MAEL
MAFF
MCOLN3
MMP9
MS4A2
MUM1L1
NFIL3
NPW
NPY1R
NRXN1
OSM
PCSK2
PENK
PEX5L
PF4V1
PHLDB2
PMAIP1
POPDC3
PPBP
PROK2
PTGS2
PTHLH
RGS16
SCHIP1
SELE
SNCA
SOCS3
SOX7
SSTR1
TAC1
TPSAB1
WIF1

Figure 31 : Regroupement hiérarchique des méningiomes invasifs et non invasifs sur la base de 130 gènes dérégulés.

Résultats

90 gènes sont sur-exprimés dans les méningiomes invasifs alors que 40 sont sous-exprimés dans ces tumeurs (p-value<0,05 selon le test non paramétrique de Mann-Whitney).

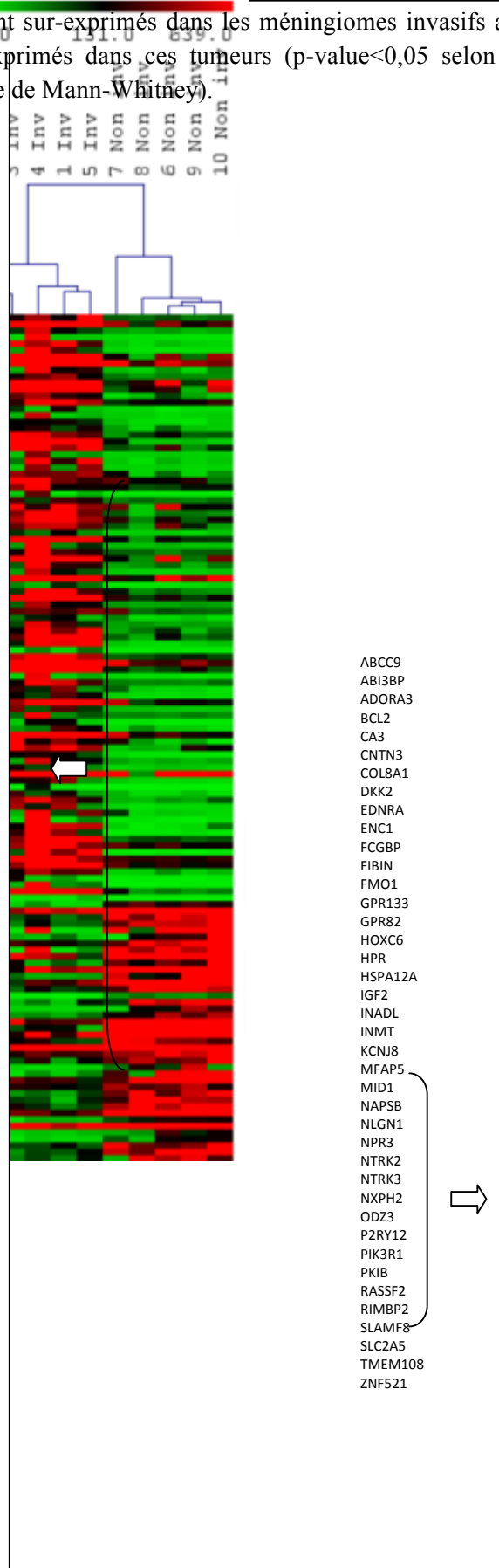
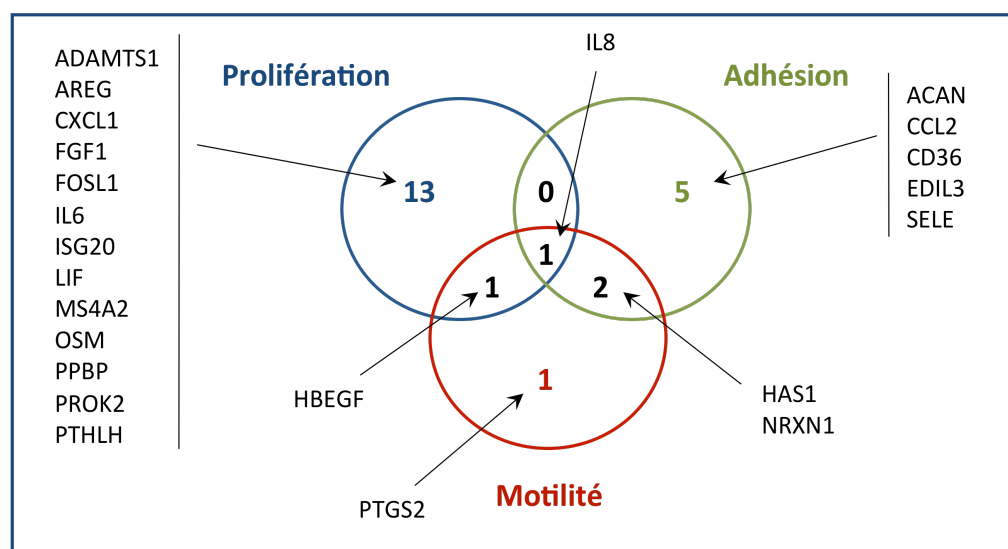


Figure 32 : Gènes surexprimés dans les méningiomes invasifs codant pour des protéines impliquées dans la prolifération, l'adhésion et la motilité cellulaire.

Ces 23 gènes sont sur-exprimés dans les méningiomes invasifs en comparaison aux méningiomes non invasifs.

Résultats

Sur les 90 gènes surexprimés dans les méningiomes invasifs, il est intéressant de retrouver deux gènes codants pour des métalloprotéinases (MMP9 et ADAMTS1), protéines impliquées dans la dégradation de la matrice cellulaire. Par une étude ontologique, nous avons également mis en évidence que sur ces 90 gènes, 23 codent pour des protéines impliquées dans au moins un des trois processus cellulaires que sont la prolifération, la motilité et l'adhésion cellulaire (Figure 32).



2. Recherche de biomarqueurs de type miARN

Dans un premier temps, nous avons recherché par la méthode d'hybridation sur membranes « à façon », mise au point au laboratoire, si les miARN peuvent être de bons marqueurs du phénotype d'invasivité des méningiomes. Sur les 282 miARN dosés par cette méthode, trois miARN, miR-126*, miR-92 et miR-145, ont un ratio MGM invasifs/MGM non invasifs supérieur à 3. Avec une deuxième méthode récemment opérationnelle, l'hybridation sur puces Affymetrix de type miRNA Genechip[®], nous avons seulement confirmé les résultats obtenus pour miR-145 (Ratio Invasifs/Non invasifs = 3,15). Or, par cette méthode, 28 autres miARN ont un ratio Invasifs/Non invasifs > 3 et 19 ont un ratio Invasifs/Non invasifs < 0,3.

L'ensemble de ces marqueurs pourraient être des marqueurs intéressants du phénotype invasif des méningiomes mais une validation par la méthode de PCR quantitative est à présent nécessaire.

3. Recherche des cibles de miR-145, marqueur potentiel du phénotype invasif des méningiomes

miR-145 ayant été montré comme surexprimé dans les méningiomes invasifs par les deux méthodes d'hybridation, nous nous sommes intéressés à ce miARN et à un rôle éventuel dans la transformation phénotypique. Pour cela, nous avons recherché les ARNm cibles de ce miARN parmi les 130 gènes précédemment décrits comme différemment exprimés dans les méningiomes invasifs et non invasifs, aucun n'est la cible de ce miARN. Les miARN jouant principalement leur rôle de régulateurs par répression de la traduction, nous avons aussi recherché les cibles de miR-145 parmi l'ensemble des transcrits connus pouvant être impliquées dans cette transformation phénotypique dans l'idée de doser les protéines codées par ces ARNm cibles. Cependant, les cibles étant très nombreuses (près d'un millier), nous avons choisi d'obtenir davantage de données concernant les autres marqueurs éventuels par PCR quantitative et de ne choisir que les cibles de plusieurs miARN marqueurs. Une telle analyse de PCR quantitative à grande échelle pourrait être menée rapidement par de nouvelles techniques qui ne sont cependant qu'en cours de développement au laboratoire.

Partie II- Etude des miARN dans l'analyse physiopathologique des gliomes

I- Sélection des échantillons de gliomes pertinents pour l'analyse

1. Comparaison avec deux méthodes de classification des gliomes

Les probesets présents sur puces Affymetrix de type U133A sont bien présents sur les puces de type U133 Plus 2.0 et sont identiques en tous points (nombre de sondes des probesets, transcrits ciblés et localisation sur les transcrits). Il nous a donc été possible de classer nos gliomes d'une part par la méthode de Li, qui utilise les mêmes puces de type U133 Plus 2.0 que celles dont nous disposons, et d'autre part par la méthode de Phillips, qui utilise les puces de type U133A.

Le test non paramétrique de Mann-Whitney sur les groupes d'échantillons indépendants (groupe 1 contenant les échantillons 1 à 4 et groupe 2 contenant les échantillons 5 à 10) mené sur logiciel MeV a mis en évidence que sur les 54 probesets décrits par Li et al, 49 sont des marqueurs significatifs et 23 le sont sur les 30 probesets publiés par Phillips (p -value $<0,05$). Nous avons comparé les coefficients de corrélation obtenus pour l'ensemble de nos échantillons par les méthodes de Phillips et Li, en prenant soit l'ensemble des probesets décrits soit en enlevant les probesets non significatifs. Les résultats étant très similaires, les résultats présentés dans le tableau 5 ont été obtenus avec l'ensemble des différents probesets décrits. Dans ce tableau sont présentés les coefficients de corrélation de tous les échantillons considérés soit comme PN soit comme MES dans la classification de Phillips, soit comme O soit comme G dans la classification de Li.

Si on considère qu'une différence minimale de 20 entre les deux coefficients de corrélation obtenus par échantillon est nécessaire pour classer l'échantillon de manière certaine dans un groupe ou dans l'autre, 21 des 25 échantillons peuvent être classés par les méthodes de Phillips et de Li.

es coefficients de corrélation sont obtenus après avoir classé les échantillons dans le groupe PN ou IES selon Phillips ou dans le groupe O ou G selon Li. Sont également présentées les valeurs absolues des différences entre les coefficients de corrélation |PN-MES| et |O-G| (les valeurs en rouge indiquent une différence inférieure à 20).

Les échantillons classés dans le groupe PN ou O sont surlignés en vert et correspondent dans le groupe Li à l'autre IES ou G en rouge. Les échantillons pour lesquels |PN-MES| et/ou |O-G| < 20 ne sont pas classés.

de ces deux types :

- des tumeurs oligodendrogiales de faible grade, appartenant au groupe O (Li *et al.*, 2009) et au type « proneural » (Phillips *et al.*, 2006) annotés dans la suite du manuscrit oligodendrogliomes;
- des glioblastomes, du groupe G (Li *et al.*, 2009) et du type « mésenchymateux » (Phillips *et al.*, 2006).

Tableau 5 : Classement des 25 échantillons selon les classifications de Phillips et Li.

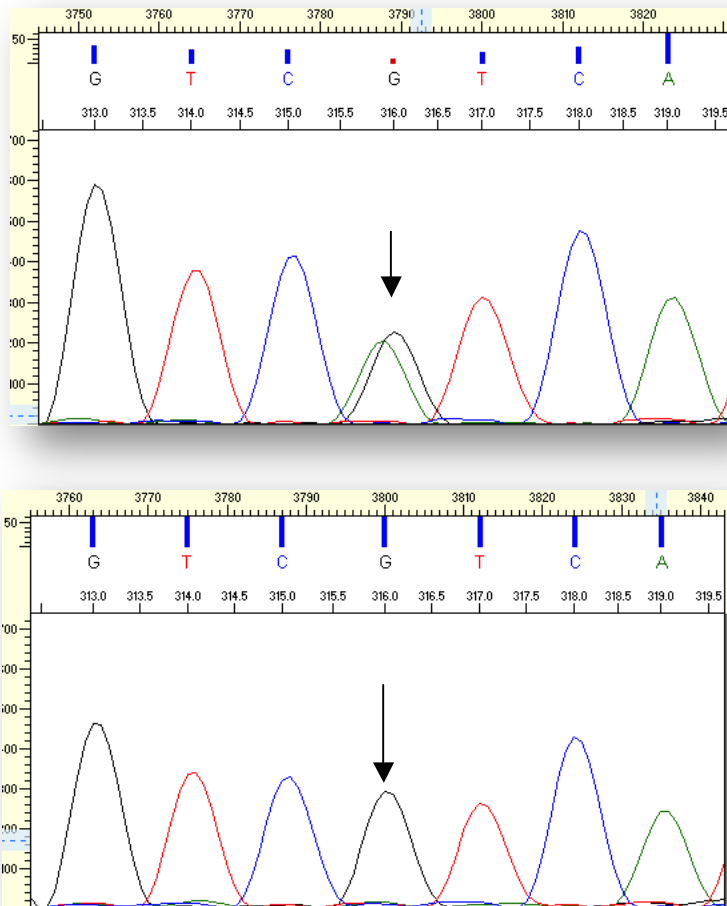
Echantillons	Phillips			Li		
	PN	MES	PN-MES	O	G	O-G
1	63	24	39	96	27	69
2	92	-36	128	94	-53	147
3	77	-7	84	93	48	45
4	87	10	77	92	-11	103
5	-1	59	60	-7	90	97
6	22	84	62	33	96	63
7	-6	90	96	12	98	86
8	-16	91	107	-54	97	151
9	-11	90	101	-77	99	176
10	27	70	43	60	84	24
11	34	-13	47	92	-41	133
12	66	1	65	92	-32	124
13	38	-15	53	92	-16	108
14	33	-14	47	91	-28	119
15	36	-15	51	88	-16	104
16	0	67	67	26	91	65
17	24	72	48	11	87	76
18	12	50	38	37	80	43
19	13	50	37	26	77	51
20	17	56	39	50	77	27
21	24	57	33	59	77	18
22	15	18	3	55	59	4
23	31	19	12	52	65	13
24	22	34	12	77	75	2
25	58	61	3	93	74	19

A : Mutation hétérozygote G395A observée dans les oligodendrogliomes.

B : Pas de mutation observée dans les glioblastomes.

2. Analyse mutationnelle du gène codant pour IDH1

Un premier couple d'amorces a été testé pour amplifier la région centrée sur le codon 132 du gène codant pour IDH1 et ce dans les différents échantillons de glioblastomes et oligodendrogliomes étudiés. Le couple d'amorce utilisé par Nobusawa (Nobusawa *et al.*, 2009) ne donnant pas de résultats probants puisque plusieurs produits d'amplification sont détectés sur gel d'agarose, un deuxième couple d'amorces, décrit par Bleeker (Bleeker *et al.*, 2009), a été testé. Les 12 échantillons étiquetés comme glioblastomes (5 à 10 et 16 à 21) après classification par les méthodes de Phillips et de Li ne présentent pas de mutation alors que les échantillons étiquetés comme oligodendrogliomes (1 à 4 et 11 à 15) présentent effectivement une mutation hétérozygote en position 395, G395A, modifiant l'acide aminé en position 132 (R132H) (Un exemple de profils de séquençage est présenté sur la figure 33).



Pour les échantillons 22 à 25, le statut IDH1 a été déterminé seulement pour l'échantillon 22 qui ne présente pas de mutation dans le codon 132. Nous avons donc exclu ces quatre échantillons de notre étude.

II- Analyse du taux d'expression des miARN dans les glioblastomes et oligodendrogliomes

1. Analyse par les méthodes d'hybridation sur membranes « à façon » et PCR quantitative

Dans un premier temps, deux méthodes ont été mises au point au laboratoire et utilisées pour savoir si les miARN peuvent être de bons marqueurs des gliomes permettant de distinguer les tissus tumoraux des échantillons contrôles mais également de distinguer les glioblastomes des oligodendrogliomes. La première consiste en une recherche assez large de miARN par hybridation sur membranes « à façon ». Sur les 282 miARN dosés par cette méthode, 15 miARN ont un ratio G/N et/ou O/N supérieur à 3 ou inférieur à 0,3 (Tableau 6).

La deuxième méthode utilisée est la PCR quantitative permettant de doser exclusivement les miARN matures de par la conformation de l'amorce permettant la reverse transcription (Annexe 4). Avec cette méthode, les 15 marqueurs décrits précédemment sont validés mais les ratios sont ajustés, du fait de la meilleure sensibilité de cette méthode. Avec cette méthode, nous avons également montré que 11 miARN supplémentaires peuvent également être considérés comme marqueurs des gliomes (Tableau 6).

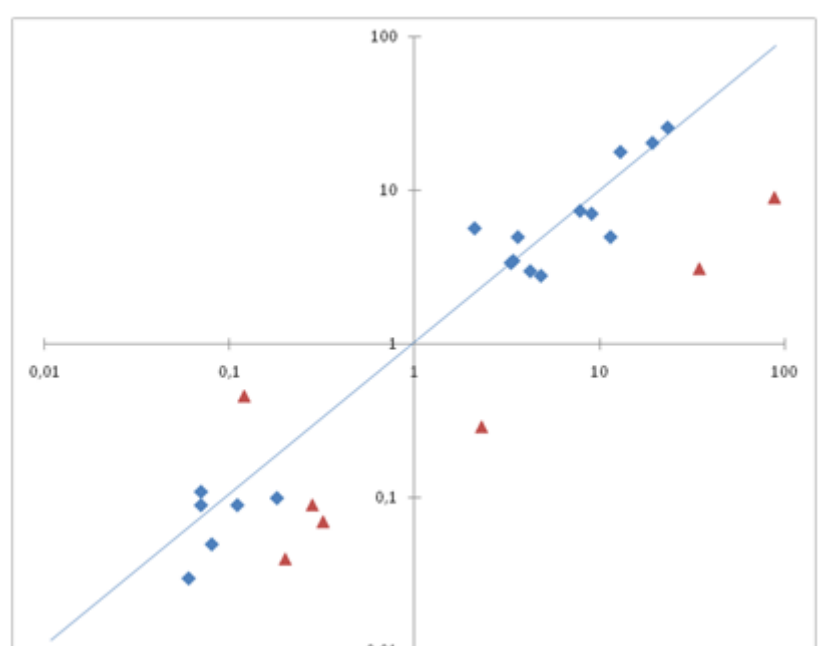
Au total 26 marqueurs diagnostiques des gliomes ont été mis en évidence. Sur ces 26 marqueurs, 14 ont une expression plus élevée dans au moins un type de gliomes en comparaison aux échantillons contrôles (ratio G/N et/ou O/N > 3) alors que 11 ont une expression plus faible dans au moins un type de gliomes (ratio G/N et/ou O/N < 0,3). Seul miR-210 a une expression plus élevée dans les glioblastomes mais plus faible dans les oligodendrogliomes en comparaison aux échantillons contrôles. Sept de ces 26 miARN sont également des marqueurs permettant de distinguer les glioblastomes des oligodendrogliomes puisque six d'entre eux ont un ratio G/O supérieur à 3 (miR-132, miR-134, miR-155, miR-21, miR-210 et miR-409-5p) et un montre un ratio G/O inférieur à 0,3 (miR-128).

Sur la figure 34 sont présentés, pour ces 26 miARN marqueurs, les ratios O/N en fonction des ratios G/N obtenus par la méthode de PCR quantitative. Les sept marqueurs distinguant les glioblastomes des oligodendrogliomes sont présentés par des triangles rouges sur la figure et les 19 autres sont présentés sous forme de losanges bleus.

34 marqueurs peuvent permettre de distinguer les gliomes des échantillons de contrôle (marqueur G/O ou < 0,3) mais également les glioblastomes des oligodendrogliomes (marqueur G/N ou < 0,3).
 miR-210 est le seul miARN de ces 26 marqueurs présentant une expression plus élevée dans les glioblastomes et plus faible dans les oligodendrogliomes en comparaison aux échantillons normaux.

	G/N	G/O	G/O	G/N	G/O	G/O
hsa-miR-21	87,8	9	9,8 [‡]	4,8	1,3	9,7 [‡]
hsa-miR-155	34,5	3,1	11,2 [‡]	4,8	0,6	8,4 [‡]
hsa-miR-15b	3,3	3,4	1	4,3	1,2	3,7 [‡]
hsa-let-7f	23,2	25,8	0,9	10,6	5,2	2
hsa-let-7a	19,2	20,5	0,9	4,1	4	1
hsa-miR-9	2,1	5,7	0,4	2,1	3,5	0,6
hsa-miR-16	11,4	5	2,3	4,5	2,3	1,7
hsa-let-7b	3,3	3,4	1	1,3	1,8	0,7
hsa-let-7d	4,2	3	1,4	1,6	2,3	0,7
hsa-miR-126	4,8	2,8	1,7	ND	ND	ND
hsa-miR-17	12,9	17,9	0,7	ND	ND	ND
hsa-miR-26b	9	7,1	1,3	ND	ND	ND
hsa-miR-374a	7,8	7,4	1	ND	ND	ND
hsa-miR-20a	3,6	5	0,7	ND	ND	ND
hsa-miR-7	0,11	0,09	1,2	0,15	0,15	1
hsa-miR-330-3p	0,08	0,05	1,7	0,25	0,32	0,8
hsa-miR-139-5p	0,07	0,09	0,8	0,13	0,08	1,6
hsa-miR-124	0	0	1	0,2	0,11	1,8
hsa-miR-132	0,28	0,09	3,2 [‡]	0,5	0,28	1,8
hsa-miR-134	0,2	0,04	5,8 [‡]	2,7	0,19	14,2 [‡]
hsa-miR-127-3p	0,06	0,03	2	0,7	0,06	11,9 [‡]
hsa-miR-339-5p	0,07	0,11	0,6	ND	ND	ND
hsa-miR-409-5p	0,32	0,07	4,6 [‡]	ND	ND	ND
hsa-miR-149	0,18	0,1	1,8	ND	ND	ND
hsa-miR-128	0,12	0,46	0,26 [‡]	0,29	0,33	0,9
hsa-miR-210 [§]	2,3	0,29	8,1 [‡]	5,6	0,5	10,7 [‡]

Figure 34 Représentation graphique des ratios d'expression des 26 marqueurs obtenus par la méthode de PCR quantitative. Losanges bleus : 19 marqueurs distinguant les tumeurs des échantillons contrôles. Triangles rouges : 7 marqueurs distinguant les GBM des ODG.



2. Analyse par la méthode d'hybridation sur puces Affymetrix de type miRNA Genechip[®]

Une nouvelle méthode de dosage de l'expression des miARN, mise sur le marché ces derniers mois, a été implantée au laboratoire et consiste en l'hybridation des ARN courts sur puce Affymetrix miRNA Genechip[®]. Ces puces permettent de doser l'expression de miARN de 71 espèces différentes et notamment de 847 miARN humains (selon la version v11 de la base de données miRBase, Avril 2008).

a. Validation des 26 marqueurs précédemment décrits

L'expression des 26 miARN marqueurs des gliomes précédemment décrits a été analysée par cette méthode d'hybridation à grande échelle. Après normalisation par le logiciel miRNA QC tool (Affymetrix), nous avons calculé les ratios d'expression de ces marqueurs entre les glioblastomes G, oligodendrogliomes O et échantillons contrôles N. Ces ratios ont été comparés aux résultats obtenus avec la PCR quantitative (Tableau 7).

Pour la plupart de ces 26 marqueurs, les résultats sont cohérents entre les deux méthodes de dosage. Bien que les ratios ne soient pas identiques, on retrouve les mêmes tendances pour la plupart des marqueurs. Pour quelques miARN, les ratios d'expression qui sont significatifs par dosage par une des deux méthodes (ie proches et supérieurs à la valeur seuil de 3 ou proches et inférieurs à la valeur seuil de 0,3) deviennent non significatifs après dosage par la deuxième méthode mais restent proches des valeurs seuils. C'est par exemple le cas de let-7b, let-7d, miR-126, miR-134 ou miR-9.

Dans les cas de miR-26b, miR-339-5p, miR-374a et miR-7, les valeurs d'intensité obtenues avec la méthode d'hybridation sur puces Affymetrix sont proches du bruit de fond et sont considérées comme non détectées ND.

et échantillons contrôles N et comparaison entre méthode d'hybridation sur puces Affymetrix de type U133 Plus 2.0 et PCR quantitative (ND). par la méthode d'hybridation ne peuvent pas être analysés puisque les valeurs d'intensité obtenues pour les différents échantillons sont proches du bruit de fond.

miARN	Hybridation sur puces Affymetrix de type miRNA Genechip			PCR quantitative		
	G/N	O/N	G/O	G/N	O/N	G/O
hsa-let-7a	3,82	4,98	0,77	19,2	20,5	0,9
hsa-let-7b	2,59	3,66	0,71	3,3	3,4	1
hsa-let-7d	2,54	3,13	0,81	4,2	3	1,4
hsa-let-7f	3,44	4,27	0,81	23,2	25,8	0,9
hsa-miR-124	0,03	0,17	0,15	0,003	0,003	1
hsa-miR-126	2,34	2,51	0,93	4,8	2,8	1,7
hsa-miR-127-3p	0,19	0,08	2,36	0,06	0,03	2
hsa-miR-128	0,10	0,68	0,14	0,12	0,46	0,26
hsa-miR-132	0,19	0,18	1,05	0,28	0,09	3,2
hsa-miR-134	0,24	0,10	2,45	0,2	0,04	5,8
hsa-miR-139-5p	0,04	0,19	0,23	0,07	0,09	0,8
hsa-miR-149	0,09	0,12	0,74	0,18	0,1	1,8
hsa-miR-155	61,43	17,44	3,52	34,5	3,1	11,2
hsa-miR-15b	11,50	7,88	1,46	3,4	3,5	1
hsa-miR-16	4,16	4,13	1,01	11,4	5	2,3
hsa-miR-17	3,50	5,37	0,65	12,9	17,9	0,7
hsa-miR-20a	6,19	9,50	0,65	3,6	5	0,7
hsa-miR-21	67,80	6,55	10,34	87,8	9	9,8
hsa-miR-210	9,37	0,82	11,41	2,3	0,29	8,1
hsa-miR-26b	ND	ND	ND	9	7,1	1,3
hsa-miR-330-3p	0,09	0,15	0,57	0,08	0,05	1,7
hsa-miR-339-5p	ND	ND	ND	0,07	0,11	0,6
hsa-miR-374a	ND	ND	ND	7,8	7,4	1
hsa-miR-409-5p	0,30	0,13	2,35	0,32	0,07	4,6
hsa-miR-7	ND	ND	ND	0,11	0,09	1,2
hsa-miR-9	2,10	15,01	0,14	2,1	5,7	0,4

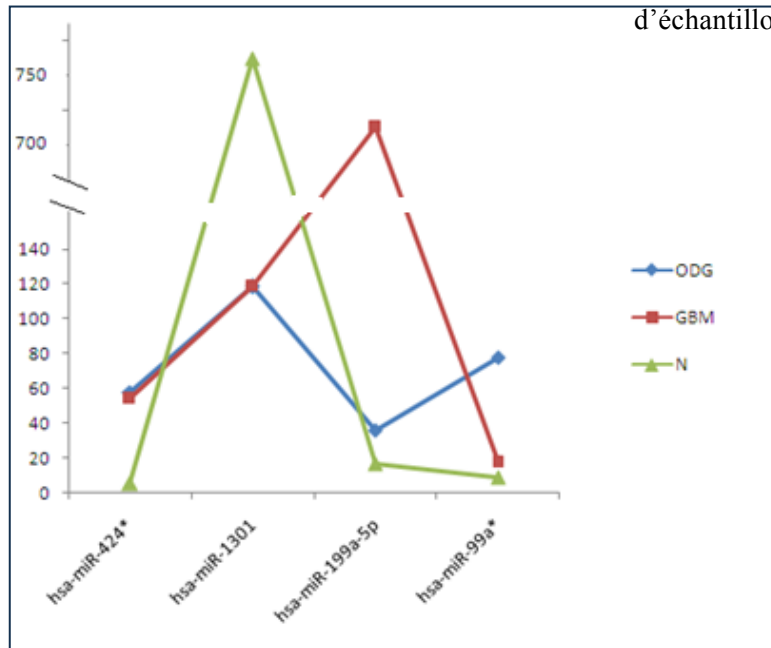
b. Recherche de biomarqueurs pour une application au diagnostic

Outre les 26 marqueurs d'intérêt dosés par PCR quantitative et validés pour la plupart par la méthode d'hybridation sur puces miRNA Genechip[®], nous avons récemment mis en évidence par cette dernière méthode d'autres miARN qui permettent de distinguer les différents types d'échantillon. Nous avons choisi ces miARN sur la base de ratios

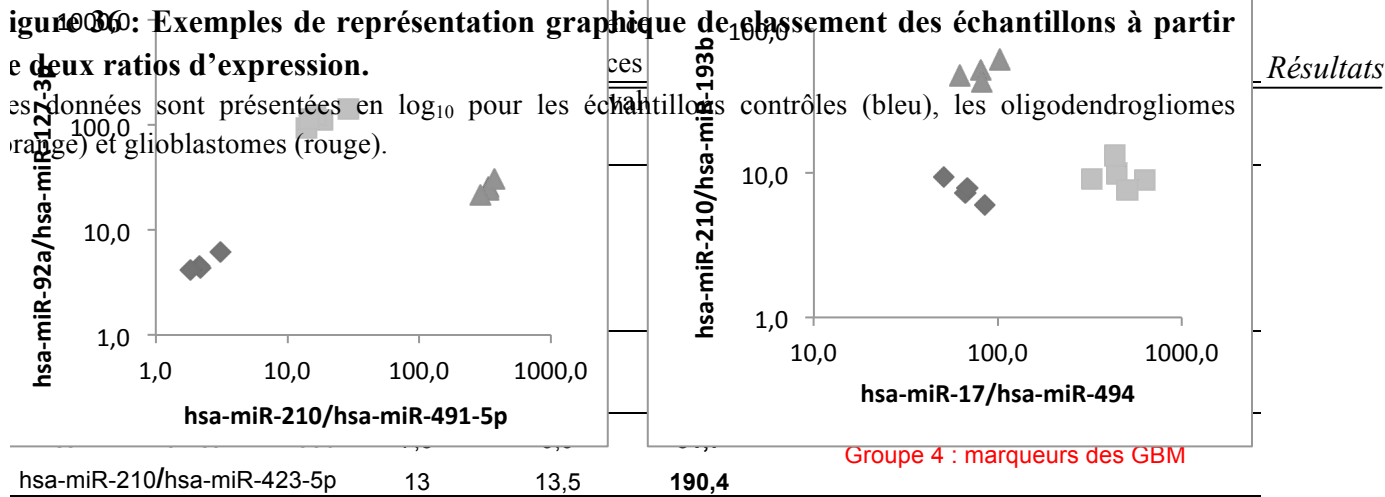
Tableau 8 : miARN brevetés classés en cinq groupes selon les échantillons qu'ils permettent de distinguer. Résultats

miARN	ODG/N	GBM/N	GBM/ODG	Groupe
hsa-miR-199a-3p	5,8	102,6	17,8	Groupe A : distingue les trois types de tumeurs adéquat en vue de la réalisation d'un éventuel kit de diagnostic
hsa-miR-139-3p	0,04	0,01	0,1	
hsa-miR-424a	11,0	10,4	0,9	Groupe B : distingue les gliomes des échantillons contrôles
hsa-miR-503	5,2	8,7	1,7	
hsa-miR-132	0,18	0,18	1,0	
hsa-miR-1301	0,16	0,16	1,0	
hsa-miR-1231	0,14	0,15	1,0	
hsa-miR-328	0,13	0,07	0,5	
hsa-miR-1180	0,12	0,07	0,6	
hsa-miR-149	0,12	0,09	0,7	
hsa-miR-491-5p	0,09	0,06	0,7	
hsa-miR-1280	0,05	0,06	1,1	
hsa-miR-490-5p	0,05	0,03	0,7	
hsa-miR-431*	0,04	0,03	0,8	
hsa-miR-770-5p	0,03	0,05	1,4	
hsa-miR-769-3p	0,02	0,02	1,0	
hsa-miR-129-5p	0,02	0,01	0,4	
hsa-miR-139-5p	0,18	0,04	0,2	
hsa-miR-135a*	6,0	0,6	0,1	Groupe C : distingue les ODG
hsa-miR-99a*	8,6	1,9	0,2	Groupe D : distingue les ODG des échantillons contrôles
hsa-miR-382	0,1	0,3	2,4	
hsa-miR-409-3p	0,1	0,5	3,4	
hsa-miR-191*	0,1	0,4	3,2	
hsa-miR-200c	1,6	227,8	139,8	Groupe E : distingue les GBM
hsa-miR-199a-5p	2,1	42,1	20,0	
hsa-miR-21*	1,1	18,6	16,9	
hsa-miR-146b-5p	1,3	10,2	7,8	
hsa-miR-31	0,2	5,1	25,4	

figure 35. Les courbes étant bien spécifiques de chaque type tissulaire, elles permettent aisément et simplement de classer les échantillons. Les 4 miARN ont été choisis de manière à obtenir des courbes spécifiques pour les trois types d'échantillons.



Cependant, cette méthode ne peut pas être utilisée comme méthode diagnostique pour typer un échantillon individuel sans une comparaison avec des valeurs d'abaque obtenues pour les trois types d'échantillon (ODG, GBM, N) sur la même plate-forme. Une alternative pour s'affranchir de cette limitation est de s'intéresser aux ratios d'expression des miARN dans un même tissu (méthode intra-tissulaire) et de choisir les ratios les plus probants permettant de distinguer les différents types d'échantillon (Gordon *et al.*, 2002 ; Avissar *et al.*, 2009). Nous avons mis en évidence 10 ratios qui peuvent être classés en quatre groupes. Un premier groupe permet la distinction des trois types d'échantillon puisque les rapports des ratios entre ces échantillons sont supérieurs à la valeur seuil de 4 (différences significatives avec $p\text{-value} < 0,05$). Un deuxième groupe comprenant quatre ratios permet de distinguer les deux types de gliomes des échantillons contrôles ($p\text{-value} < 0,05$), et 2 autres groupes comprennent les ratios permettant de distinguer soit les ODG soit les GBM des autres échantillons (Tableau 9).



Les valeurs de ce tableau peuvent être utilisées comme abaques pour la détermination du statut d'un échantillon individuel et ce, en principe, même pour des valeurs d'expression obtenues sur une plate-forme différente. Une autre manière simplifiée de réaliser le diagnostic d'un échantillon est d'utiliser une représentation graphique (Figure 36). L'ensemble de ces données fait l'objet de trois dépôts de brevet.

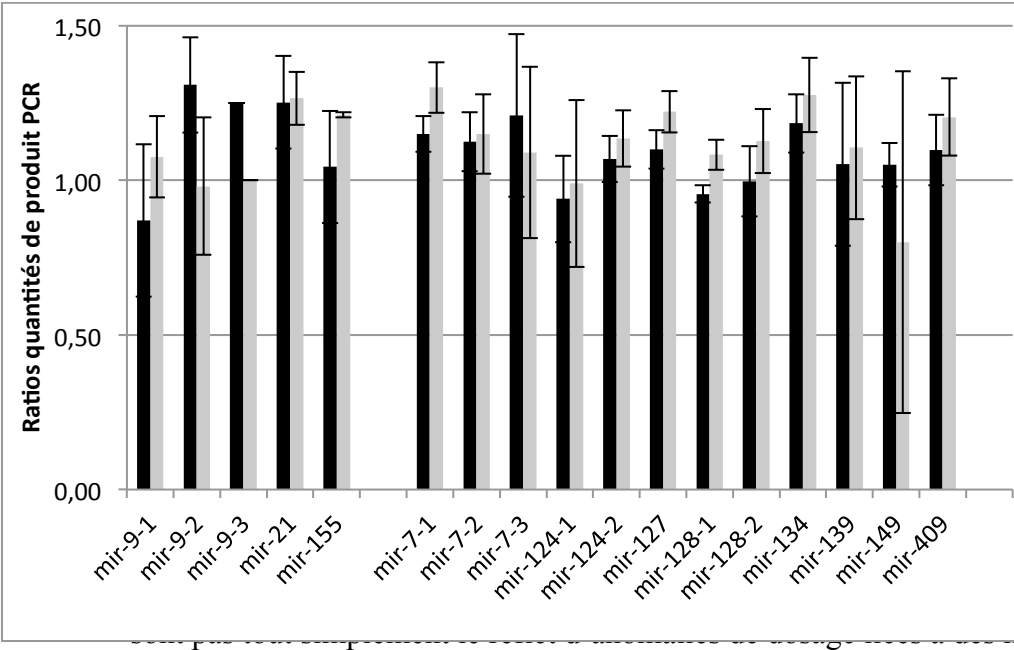


Figure 37 : Analyse génomique par PCR des loci codant les miARN marqueurs des gliomes. Barres noires : ratios GBM/contrôles et barres grises : ratios ODG/contrôles

III- Rationalisation des dérégulations d’expression des miARN dans les gliomes

Après avoir décrit les 26 premiers marqueurs validés par PCR quantitative, nous avons souhaité mener différentes études, génomiques, épigénétiques et transcriptomiques pour rationaliser les différences d’expression observées pour ces marqueurs.

1. Altérations génétiques



ou le séquençage, pour
ions ou mutations dans
rences d’expression des
iARN dont les résultats
124, miR-127-3p, miR-
trois surexprimés dans
ces d’expression entre
mplification ou délétion
s pour miR-7, miR-9 et
ce de mutation dans les
xpression constatées ne
utations ponctuelles.

2. Expression des gènes hôtes

Les miARN peuvent être co-exprimés avec leurs gènes hôtes, qu'ils soient codants ou non codants (Baskerville et Bartel, 2005). Sur les 26 miARN marqueurs des gliomes précédemment décrits, tous ne sont pas codés par des gènes présents dans des unités de transcription définies. En effet, miR-21, let-7a, miR-374a, let-7d, let-7b, miR-210, miR-409-5p, miR-132, miR-134, miR-127, miR-124 sont codés par des gènes présents dans des régions intergéniques. De plus, certains miARN sont codés par plusieurs gènes pouvant être soit dans des régions intergéniques soit présents dans des unités de transcription définies. Par exemple, miR-128 et miR-16 sont tous deux codés par deux gènes présents dans des unités de transcription définies (respectivement par mir-128-1/mir-128-2 et mir-16-1/mir-16-2), let-7f est codé par deux gènes (let-7f-1/let-7f-2 dont seul let-7f-2 est présent dans une unité de transcription définie) et miR-7 et miR-9 sont tous deux codés par trois gènes dont seulement deux sont présents dans des unités de transcription définies (respectivement mir-7-1/mir-7-3 et mir-9-1/mir-9-2). De plus, certains loci codant pour des miARN sont organisés en « cluster » comme miR-16-2 et miR-15b ou miR-17 et miR-20a.

Nous avons analysé les taux d'expression de 17 gènes hôtes sur puces Affymetrix U133 Plus 2.0 pour tenter de rationaliser les variations d'expression de 15 miARN entre les deux types de gliomes et les tissus normaux (Tableau 10).

Pour quelques miARN, on observe une bonne corrélation entre les différences de niveaux d'expression des miARN et de leur gène hôte. Pour miR-128, une expression plus faible dans les glioblastomes est corrélée à une baisse d'expression des gènes hôtes de mir-128-1 et mir-128-2 que sont R3HDM1 et ARPP-21 respectivement. Pour miR-139, dont l'expression est significativement plus faible dans les glioblastomes et oligodendrogliomes en comparaison au tissu normal, l'expression du gène hôte PDE2A est également diminuée dans ces deux types de gliomes. Nous observons la même corrélation entre les différences d'expression de miR-7 et du gène hôte de mir-7-3, alors que l'expression du gène hôte de mir-7-1 n'est pas différente entre les gliomes et les tissus normaux. Quant aux miARN miR-155 et miR-15b/miR-16-2 en « cluster », leur surexpression dans les glioblastomes est bien corrélée à une surexpression de leurs gènes hôtes, respectivement MIR155HG et SMC4 alors qu'ils ne sont pas surexprimés dans les oligodendrogliomes. Pour tous les autres miARN, il n'y a pas de corrélation entre les ratios d'expression des miARN et des gènes hôtes que ce soit entre glioblastomes et tissus normaux ou entre oligodendrogliomes et tissus normaux.

pression des miARN.

miARN pour lesquels une coexpression entre le gène codant et son gène hôte dans les tissus normaux a été rapportée (Baskerville et Bartel, 2005)

Etude de l'expression de 17 gènes hôtes de 19 gènes codants GBM/N 15 miARN

ODG/N

Résultats

oci miARN

Localisation			Niveaux d'expression			
miARN	Gènes hôtes	Chromosomes	GBM/N	ODG/N		
mi-mir-128-1 [†]	R3HDM1	2q21.3	0,2	0,1	0,3	0,5
mi-mir-128-2	ARPP-21	3p22.3	0,1	0,1	0,7	0,5
mi-mir-139 [†]	PDE2A	11q13.4	0,1	0,1	0,3	0,1
mi-mir-7-3 [†]	C19orf30	19p13.3	0,1	0,2	0,2	0,1
mi-mir-9-2	LOC645323	5q14.3	1,1	2,1	3	5,7
mi-mir-9-1 [†]	C1orf61	1q22	0,5	2,1	1,7	5,7
mi-mir-155	MIR155HG	21q21.3	5,9	34,5	0,7	3,1
mi-mir-15b	SMC4	3q26.1	4,8	3,3	1,8	3,4
mi-mir-16-2				11,4		5
mi-mir-17				12,9		17,9
mi-mir-20a	MIR17HG	13q31.3	1,4	3,6	2,9	5
mi-mir-26b	CTDSP1	2q35	1,4	9	1,6	7,1
mi-mir-16-1	DLEU2	13q14.2	1	11,4	0,9	5
mi-let-7f-2	HUWE1	Xp11.22	0,8	23,2	0,8	25,8
mi-mir-126 [†]	EGFL7	9q34.3	0,7	4,8	0,6	2,8
mi-mir-149	GPC1	2q37.3	2,8	0,2	0,9	0,1
mi-mir-330	EML2	19q13.32	0,7	0,1	0,6	0,1
mi-mir-339	C7orf50	7p22.3	1,2	0,1	0,9	0,1
mi-mir-7-1	HNRNPK	9q21.32	1	0,2	1	0,1

3. Modifications épigénétiques

Les différences d'expression des miARN entre les différents tissus (glioblastomes, oligodendrogliomes et tissus normaux) pourraient être expliquées par des modifications épigénétiques telles que la méthylation des promoteurs au niveau des îlots CpG.

Sur les 26 miARN décrits précédemment, nous nous sommes donc intéressés à 7 miARN dont les promoteurs présentent effectivement des îlots CpG (la région promotrice étant définie 2kb en amont du site de début de transcription décrit par Marson (Marson *et al.*, 2008)) et dont les conditions de PCR et pyroséquençage ont permis d'obtenir des résultats interprétables. Pour mir-339, deux sites de début de transcription étant décrits, nous nous sommes intéressés aux 2 régions promotrices en amont de ces sites de début de transcription.

Sur la figure 38 sont présentées, pour les 8 régions promotrices étudiées, les moyennes des taux de méthylation des cinq positions CpG étudiées et ce, pour chaque type d'échantillon (contrôles, glioblastomes et oligodendrogliomes).

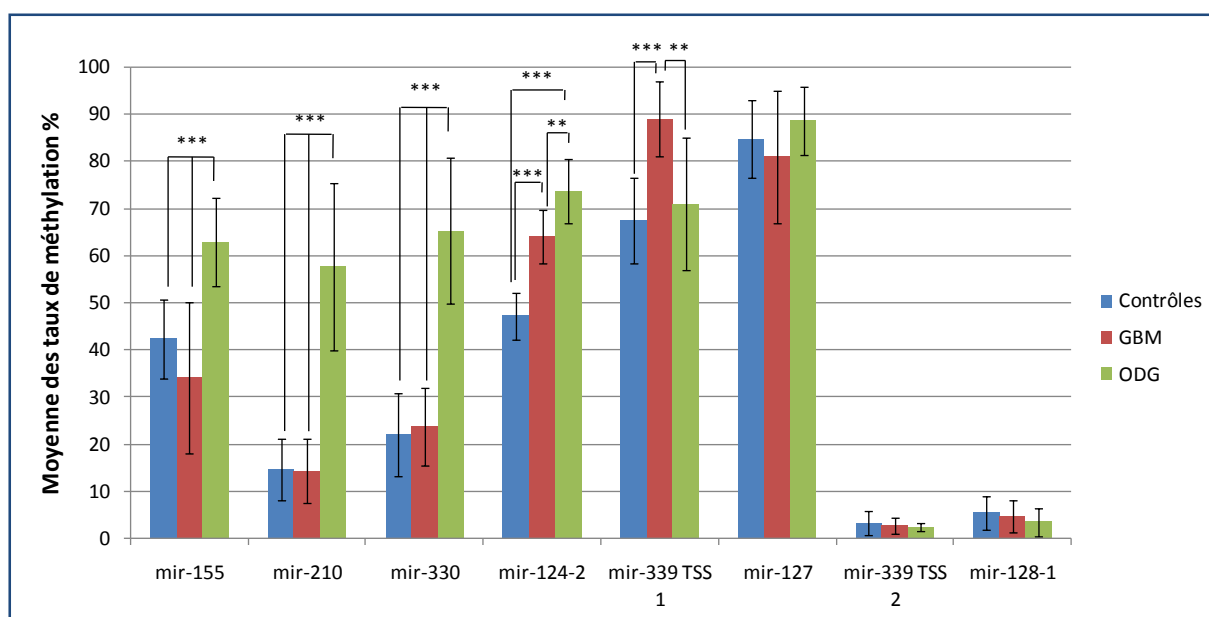


Figure 38 : Etude de méthylation des promoteurs.

Les moyennes des taux de méthylation sont présentées pour 8 régions promotrices (dont 2 concernant mir-339) et ce pour chaque type d'échantillon (GBM = glioblastomes, ODG = oligodendrogliomes). Les p-values sont calculées sur la base du test non paramétrique de Mann-Whitney (***) : $p < 0.001$; ** : $0.001 < p < 0.01$).

Pour trois régions promotrices (mir-127, mir-128-1 et mir-339 TSS2), les moyennes des taux de méthylation ne sont pas significativement différentes entre les trois types d'échantillons et n'expliquent donc pas les différences d'expression des miARN miR-127-3p, miR-128 et miR-339-5p. Dans le cas de mir-127, ces moyennes sont très élevées (84,5 ; 81 et 88,6 respectivement pour les échantillons contrôles, GBM et ODG) alors qu'elles sont faibles pour mir-128-1 (5,4 ; 4,7 et 3,4 respectivement pour les échantillons contrôles, GBM et ODG)

et mir-339 TSS2 (3,2 ; 2,8 et 2,3 respectivement pour les échantillons contrôles, GBM et ODG).

Pour mir-124-2, bien que les moyennes des taux de méthylation soient significativement différentes entre les trois types d'échantillons (ODG>GBM>Contrôles), les différents ratios (GBM/Contrôles, ODG/Contrôles et ODG/GBM) sont proches de 1 et ne permettent pas d'expliquer les différences d'expression du miARN mature miR-124. Il en est de même pour mir-339 TSS1 dont les ratios GBM/Contrôles et GBM/ODG sont proches de 1.

Pour les régions promotrices de mir-155, mir-210 et mir-330, on n'observe pas de différence significative entre les moyennes des taux de méthylation des échantillons contrôles et des glioblastomes. Les moyennes des taux de méthylation des oligodendrogliomes sont, quant à elles, significativement différentes des deux autres types d'échantillons. Pour mir-155, les ratios des taux de méthylation ODG/GBM et ODG/contrôles (1,8 et 1,5) ne concordent pas avec les différences d'expression de miR-155 entre les différents tissus. Par contre, pour mir-210 et mir-330, les ratios des taux de méthylation ODG/GBM et ODG/contrôles peuvent expliquer les expressions plus ou moins faibles de ces miARN matures dans les oligodendrogliomes en comparaison aux autres tissus.

4. Hypoxie

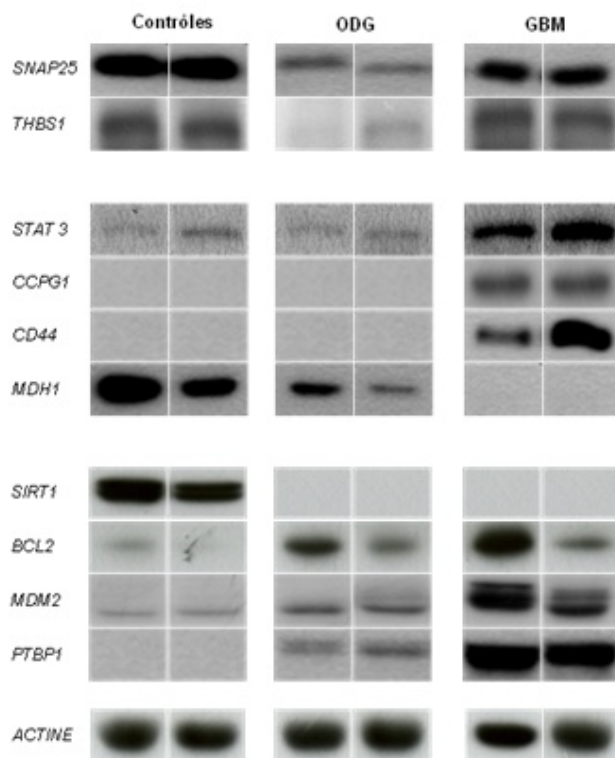
Certains miARN, dosés dans les cellules de glioblastomes U87, présentent des différences d'expression liées aux taux d'oxygénation auxquels sont soumises ces cellules, comme miR-15b, miR-16, miR-17, miR-20a, miR-210, let-7a, let-7b, let-7d et let-7f. En effet, l'expression de ces miARN augmente avec l'hypoxie ; les ratios entre la condition à 0,3% d'O₂ et à 20% d'O₂ variant entre 1,5 et 2,9.

IV- Analyse des cibles des miARN marqueurs des gliomes

Les cibles des 26 miARN ont été recherchées *in silico* et les cibles les plus pertinentes ont été choisies sur la base de leur ontologie (rôle dans l'apoptose, la prolifération cellulaire et la motilité). Nous avons évalué les taux d'ARNm et de protéines dans les trois types de tissus (glioblastomes, oligodendrogliomes et tissus contrôles) pour 9 cibles sélectionnées ainsi que pour CD44, protéine impliquée dans la production de miR-21 (Bourguignon *et al.*, 2009) et dans l'activation de STAT3 (Lee *et al.*, 2009a), une des 9 cibles choisies.

Figure 39 : Détection par western blot de *Résultats*
quelques protéines cibles des miARN
d'intérêt, marqueurs des gliomes.

Concernant le taux des protéines dont la quantité est estimée en western blot, on observe la présence des protéines SNAP25 et THBS1 en forte quantité dans les échantillons contrôles et glioblastomes et non dans les oligodendrogliomes. Les protéines STAT3, CCPG1 et CD44 sont, quant à elles, présentes en forte quantité seulement dans les glioblastomes alors que la protéine MDH1, absente dans ces tumeurs, est plus fortement présente dans les échantillons contrôles que dans les oligodendrogliomes. Les protéines SIRT1, BCL2, MDM2 et PTBP1 permettent de distinguer échantillons contrôles des gliomes. En effet, SIRT1 est absente dans les deux types de gliomes et présente dans les échantillons contrôles alors que les trois autres protéines sont absentes de ces échantillons et présentes dans les deux types de gliomes (Figure 39).



Quant aux taux en ARNm, dosés sur puce Affymetrix U133 Plus 2.0, ils permettent de classer ces cibles en deux groupes (Tableau 11). D'une part, on observe que pour trois des neuf cibles (SNAP25, STAT3, MDH1) ainsi que pour CD44, les variations des taux en ARNm entre échantillons tumoraux et échantillons contrôles corrélaient assez bien avec les variations des taux en protéines. Pour les six autres cibles, il n'y a pas de corrélation évidente entre les taux en ARNm et protéines.

Les protéines sont dosées par Western blot (résultats présentés sur la figure 39) et les ARNm par hybridation sur puce Affymetrix U133 Plus 2.0. *Résultats*

GBM : glioblastomes, ODG : oligodendrogliomes, N : échantillons contrôles

Les ratios supérieurs à 3 sont indiqués en gras et ceux inférieurs à 0,3 sont indiqués en italique souligné.

[†] Signaux indétectables dans les échantillons contrôles (Ratios gliomes/N infinis)

[‡] Signaux indétectables dans les gliomes (Ratios gliomes/N proches de 0)

[∞] Signaux indétectables dans les échantillons contrôles (Ratios gliomes/N infinis)

	GBM/N		ODG/N		Cibles de miARN...	
	ARNm	protéine	ARNm	protéine	...surexprimés	...sous-exprimés
SNAP25	<u>0,06</u>	0,6	<u>0,11</u>	<u>0,2</u>	hsa-miR-16	/
STAT3	2,8	5	1	0,9	hsa-miR-17, hsa-miR-20a	/
CD44	18,0	∞	1,8	1 [†]	/	/
MDH1	<u>0,3</u>	<u>0[‡]</u>	<u>0,3</u>	<u>0,3</u>	hsa-miR-15b, hsa-miR-16, hsa-miR-26b, hsa-miR126	/
SIRT1	0,5	<u>0[‡]</u>	1,5	<u>0[‡]</u>	/	hsa-miR-132
CCPG1	0,9	∞	1	1 [†]	hsa-miR-21, hsa-miR-155, hsa-miR-374a	hsa-miR-139-5p
BCL2	0,7	3,5	0,9	3,3	hsa-miR-15b	hsa-miR-139-5p
MDM2	1,7	8,3	0,8	3	hsa-let-7b, hsa-let-7f	hsa-miR-339-5p
PTBP1	3,2	∞	1,1	∞	/	hsa-miR-124, hsa- miR-339-5p, hsa-miR-149
THBS1	3,6	1,1	0,5	<u>0,2</u>	hsa-miR-21, hsa-miR-17, has-miR-20a, let-7f	/

Le tableau 11 récapitule les miARN que nous avons mis en évidence comme dérégulés dans les gliomes et qui interagissent avec les ARNm cibles. Quelques incohérences sont à remarquer comme par exemple une expression plus forte de l’ARNm et de la protéine STAT3 dans les glioblastomes alors que les miARN ciblant cet ARNm (miR-17/miR-20a) sont surexprimés dans ces tumeurs. Cependant, dans plusieurs cas, on observe une cohérence entre les taux de miARN et les taux d’ARNm cibles et de protéines dans les différents échantillons. Par exemple, pour MDH1, les taux plus faibles de protéines dans les gliomes peuvent être corrélés à une surexpression de 4 miARN dans ces tumeurs en comparaison aux tissus contrôles (miR-15b, miR-16, miR-26b et miR-126). Concernant PTBP1, on observe également une bonne corrélation entre la sous-expression de 3 miARN (miR-124, miR-149 et miR-339-5p) et la surexpression de la protéine dans les tissus tumoraux.

Discussion et perspectives

I- Etude du phénotype invasif des méningiomes

L'étude initiée sur les méningiomes a permis de mettre en évidence un seul miARN, miR-145, ayant une différence d'expression significative entre les méningiomes invasifs et non invasifs par utilisation de deux méthodes d'hybridation (hybridation sur membranes « à façon » et hybridation sur puces Affymetrix de type miRNA Genechip® permettant le dosage de respectivement 281 et 847 miARN). Cependant, avec le dosage par la deuxième méthode, nous avons mis en évidence plusieurs autres miARN qui sembleraient être de bons marqueurs de ce phénotype invasif. Le recours à une technique de PCR quantitative à grande échelle pour valider ces miARN marqueurs est désormais indispensable. C'est seulement après avoir obtenu des données complémentaires sur les miARN et avoir montré leur authentique qualité d'indicateur de ce phénotype que nous pourrions nous intéresser aux cibles de ces marqueurs. Cette recherche de cibles pourra d'une part être axée sur les ARNm que nous avons décrits comme ayant une expression différentielle entre méningiomes invasifs et non invasifs et d'autre part sur la caractérisation du pool protéique cellulaire. Une telle caractérisation est possible par plusieurs méthodes décrites comme la méthode SILAC (Stable isotope labelling with amino acids in cell culture) (Vinther *et al.*, 2006 ; Baek *et al.*, 2008) ou iTRAQ (isobaric tag for relative and absolute quantitation) (Taguchi *et al.*, 2008), cette dernière méthode étant actuellement développée au laboratoire.

L'étape suivante sera de vérifier expérimentalement que les cibles étudiées sont de réelles cibles des miARN d'intérêt et que la modulation de ces miARN *in vitro* par transfection de molécules précurseurs ou inhibitrices des miARN affecte bien l'invasion des cellules de méningiomes. Un point limitant à cette étude serait cependant la faible durée de vie des cellules primaires de méningiomes mises en culture. Pour pallier ces difficultés, nous avons collecté récemment un ensemble de lignées cellulaires de méningiomes, immortalisées ou non par expression de hTERT (human telomerase reverse transcriptase) dont le phénotype d'invasivité devra être caractérisé *in vitro* par les méthodes décrites dans cette étude (Tanaka *et al.*, 1989 ; Lee, 1990 ; Püttmann *et al.*, 2005 ; Baia *et al.*, 2006 ; Cargioli *et al.*, 2007).

II- Les miARN comme outils diagnostiques des gliomes

Nous avons utilisé 3 méthodes pour doser les miARN dans trois types d'échantillons tissulaires, des tumeurs gliales de bas grade (oligodendrogliomes) et de haut grade (glioblastomes) et des échantillons contrôles : les méthodes d'hybridation sur membranes « à façon » et hybridation sur puces Affymetrix de type miRNA Genechip[®] ainsi que la méthode de PCR quantitative.

Alors que 26 miARN ont été mis en évidence dans un premier temps par les méthodes d'hybridation sur membranes « à façon » et PCR quantitative, 28 miARN supplémentaires ont été dosés récemment par la méthode d'hybridation sur puces Affymetrix. L'ensemble de ces miARN fait l'objet de dépôts de brevets pour leur pouvoir diagnostique, distinguant les gliomes des échantillons contrôles (39 des 54 miARN) mais également les oligodendrogliomes des glioblastomes (15 autres miARN). Bien que quelques études aient été menées sur l'analyse de l'expression des miARN dans les astrocytomes de différents grades (Ciafre *et al.*, 2005 ; Gaur *et al.*, 2007; Malzkorn *et al.*, 2009 ; Lavon *et al.*, 2010) et oligodendrogliomes (Nelson *et al.*, 2006; Silber *et al.*, 2008) aucune étude n'a fait état des différences d'expression des miARN dans ces deux types de tumeurs.

Sur les 26 premiers miARN que nous avons décrits, 6 miARN n'ont jamais été décrits dans les gliomes (let-7a, let-7b, let-7f, miR-374a, miR-339-5p et miR-409-5p) et pour miR-26b et miR-126, nos données sont contradictoires avec celles de la littérature ; ces miARN étant décrits comme sous-exprimés dans les gliomes (respectivement dans les études de Gaur *et al.*, 2007 et Lavon *et al.*, 2010). Ces différences peuvent être probablement expliquées par la nature de l'échantillon tumoral (tissulaire ou cellulaire) mais également par la technique de dosage des miARN utilisée. En effet, la technique de PCR quantitative, que nous avons mise au point au laboratoire, permet un dosage spécifique des miARN matures, décrits dans la base de données miRBase v12, du fait de la conformation en boucle de l'amorce de transcription inverse (Annexe 4) alors que l'hybridation sur puces doit permettre un dosage de populations de variants de taille de miARN matures. En effet, les méthodes de caractérisation des miARN basées sur la technique de séquençage ont mis en évidence des populations de miARN matures de différentes tailles, appelés isomiRs, obtenus par clivage alternatif de Drosha et Dicer (Morin *et al.*, 2008).

Dans notre étude, pour le dosage des miARN et la recherche de miARN biomarqueurs des glioblastomes et oligodendrogliomes, nous avons utilisé des tumeurs primaires, obtenues par exérèse tumorale. Des méthodes dites non « invasives », contrairement à l'exérèse ou à la biopsie tumorale, ont été décrites telles que l'utilisation de fluides biologiques comme le sang pour la recherche de miARN comme biomarqueurs tumoraux (Mitchell *et al.*, 2008). Pour pallier l'éventuelle dégradation des ARN présents dans le sang, nous envisageons au laboratoire de rechercher dans les exosomes circulants des miARN qui seraient des biomarqueurs tumoraux intéressants. En effet, les exosomes sont des microvésicules membranaires de 30 à 100 nm sécrétées dans le milieu extra-cellulaire et permettant la communication inter-cellulaire. Ces vésicules sont bien présentes dans le sang (Hunter *et al.*, 2008) et contiennent des ARNm mais également des miARN, qui ne sont pas soumis à la dégradation dans ces vésicules (Valadi *et al.*, 2007). Des analyses préliminaires nous ont permis de valider les résultats de Skog et ses collègues à savoir que les cellules de glioblastomes produisent bien des exosomes et que ces vésicules contiennent bien des miARN (Skog *et al.*, 2008).

Les contenus en miARN dans les exosomes circulants de patients atteints de glioblastomes et oligodendrogliomes permettront par la suite de déterminer si des biomarqueurs intéressants peuvent être mis en évidence par cette méthode non « invasive » et de comparer les contenus en miARN intra-tissulaires, présents dans le sang et dans les exosomes circulants.

III- Rationalisation des différences d'expression des miARN dans les gliomes

Les variations d'expression mesurées entre les différents tissus peuvent être attribuées à de vraies dérégulations de quantités tissu-dépendantes mais pourraient également être dues à des mutations présentes dans les séquences des miARN. En effet, les miARN étant de courte taille, une simple mutation pourrait empêcher la détection de ces miARN par les méthodes que nous utilisons que sont l'hybridation sur membranes et les puces commerciales, par défaut d'hybridation des miARN aux sondes, ainsi que la PCR quantitative par défaut d'hybridation des amorces. Quant aux réelles différences de quantités des miARN, elles peuvent être expliquées par des différences génomiques (nombre de copies des gènes des miARN ou coexpression avec leurs gènes hôtes), par des régulations post-transcriptionnelles,

par des différences épigénétiques (méthylation des promoteurs des gènes), dues à la composition cellulaire des échantillons tissulaires ou à l'effet environnemental.

Les loci des gènes codant quelques uns des miARN biomarqueurs intéressants ont été étudiés et n'ont pas montré d'altérations dans les divers tissus étudiés (échantillons contrôles, oligodendrogliomes et glioblastomes) pouvant expliquer les différences d'expression de ces miARN. En effet, pour les miARN miR-7, miR-124, miR-127, miR-128, miR-134, miR-139, miR-149 et miR-409, leur expression plus faible dans les échantillons tumoraux en comparaison aux échantillons contrôles n'est pas liée à une délétion ou mutation au niveau de leurs loci. De même aucune modification dans le nombre de copies des gènes codant pour miR-9, miR-21 et miR-155 ne peut expliquer l'expression plus élevée de ces miARN dans les tissus tumoraux.

Les miARN peuvent être dans des unités de transcription définies codant pour des protéines ou dans des régions intergéniques. L'étude de la coexpression des miARN présents dans des unités de transcription définies et de leurs gènes hôtes a mis en évidence qu'il existe bien une coexpression pour :

- miR-7 et le gène C19orf30, hôte de mir-7-3
- miR-128 et les gènes R3HDM1 et ARPP21, hôtes respectifs de mir-128-1 et mir-128-2
- miR-139-5p et le gène PDE2A, hôte de mir-139

Ces résultats sont cohérents avec ceux décrits par Baskerville et Bartel (Baskerville et Bartel, 2005) dans des tissus sains. Dans le cas de miR-126, à la différence de Baskerville et Bartel, nous avons montré que les variations d'expression entre les gliomes et les échantillons contrôles ne sont pas corrélées aux variations d'expression du gène EGFL7, hôte de mir-126. Cette co-expression semble donc être perturbée dans le cas des gliomes, comme cela a été démontré aussi dans le cancer du colon (Diaz *et al.*, 2008).

Plusieurs gènes codants pour les miARN sont regroupés en « clusters » comme par exemple mir-16-1/mir-15a (Chromosome 13q14.2) ou mir-16-2/mir-15b (Chromosome 3q25.33). Nous avons décrit que miR-16 est surexprimé dans les gliomes ainsi que miR-15b alors qu'aucune différence d'expression de miR-15a n'a été observée. On peut donc penser que la dérégulation d'expression de miR-16 dans les tumeurs est due à une dérégulation du « cluster » mir-16-2/mir-15b. Un autre « cluster », souvent dérégulé dans les tumeurs, est composé des gènes mir-17, mir-18a, mir-19a, mir-19b-1, mir-20a et mir-92a-1 localisé sur le

chromosome 13q31.3 (He *et al.*, 2005b). Nous trouvons ce « cluster » surexprimé dans les gliomes puisque nous avons montré une surexpression des miARN miR-17 et miR-20a. Le fait que les autres miARN ne soient pas observés comme dérégulés peut être attribué à des événements post-transcriptionnels comme ceux décrits par Obernosterer et ses collègues pour miR-138 par exemple (Obernosterer *et al.*, 2006). Ces auteurs montrent, au vu de l'expression ubiquiste du pré-miARN dans plusieurs tissus (rein, vessie, poumon, rate,...) que l'expression tissu-spécifique de ce miARN (dans le cerveau notamment) est due à une régulation post-transcriptionnelle par fixation d'un facteur sur le pré-miARN empêchant l'action de l'enzyme Dicer.

Plusieurs miARN que nous trouvons dérégulés dans les gliomes sont connus pour être enrichis dans le cerveau voire spécifiques de ce tissu comme miR-9, miR-124, miR-128, miR-132, miR-134 et miR-409-5p (Cao *et al.*, 2006; Fiore *et al.*, 2009). Concernant miR-9, sa surexpression dans les oligodendrogliomes pourrait être le résultat d'une dédifférenciation des oligodendrocytes lors de la tumorigenèse puisqu'il a été montré que ce miARN est sous-exprimé dans les cellules oligodendrocytaires lors de leur différenciation chez le rat (Lau *et al.*, 2008). Quant aux cinq autres miARN (miR-124, miR-128, miR-132, miR-134 et miR-409-5p), leur sous-expression dans les gliomes semble conforter l'idée que le tissu tumoral étudié est exempt de cellules neuronales normales qui expriment de manière enrichie ou exclusivement ces miARN. En effet, miR-124 a été décrit, chez la souris, comme étant le miARN le plus exprimé dans le cerveau représentant près de 25-48% des miARN présent dans le cerveau (Lagos-Quinatan *et al.*, 2002), il est exprimé dans les neurones matures (Kapsimali *et al.*, 2007) et a été effectivement décrit comme moins exprimé dans les glioblastomes que dans les tissus cérébraux non tumoraux (Silber *et al.*, 2008). miR-128 et miR-132 sont également connus pour être fortement exprimés dans les neurones (Smirnova *et al.*, 2005; Vo *et al.*, 2005) et miR-134 comme exprimé dans les dendrites (Schratt *et al.*, 2006). Quant à miR-409-5p, le gène le codant est en « cluster » avec plusieurs gènes codant des miARN cerveau-spécifique dont mir-134 (Fiore *et al.*, 2009).

Parmi les miARN que nous retrouvons dérégulés dans les gliomes, d'autres sont connus pour être fortement exprimés dans les cellules endothéliales comme miR-21, miR-126, ainsi que les membres de la famille let-7 (Kuehbach *et al.*, 2007). Leur expression que nous observons élevée dans les gliomes pourrait être expliquée par une néovascularisation des échantillons tumoraux. Malgré cette néovascularisation, les tumeurs restent souvent hétérogènes et certains foyers peuvent être hypoxiques. La forte expression de miR-210 que

nous avons mise en évidence dans les glioblastomes serait le témoin de cette hypoxie tumorale dans ces tumeurs comme cela a déjà été montré dans les tumeurs du sein ou du colon (Kulshreshta *et al.*, 2007 ; Camps *et al.*, 2008). Cette caractéristique est également confirmée par les différences d'expression que nous avons observées pour certains marqueurs hypoxiques SLC2A1, HIF1 α , EFNA1, CA9, HIG2 et LOX (Le *et al.*, 2007) entre glioblastomes et échantillons contrôles dosés sur puces Affymetrix U133 Plus 2.0; ces marqueurs étant surexprimés (ratios de 2 à 35) dans les glioblastomes.

Quant aux oligodendrogliomes, pour lesquels nous n'avons pas observé de surexpression des marqueurs hypoxiques par rapport aux échantillons contrôles, nous avons montré une expression plus faible de miR-210 dans ces tumeurs en comparaison aux échantillons contrôles ; cette baisse d'expression pouvant être corrélée à l'hyperméthylation du promoteur de mir-210 observée dans ces tumeurs.

IV- Fonction des miARN dans les tumeurs gliales

Certains miARN, décrits dans cette étude comme dérégulés dans ces tumeurs, jouent un rôle dans la régulation de la traduction d'un certain nombre de cibles, dont nous avons montré une expression protéique différente dans les divers tissus étudiés. Des voies moléculaires incluant ces miARN et ces protéines cibles ont été envisagées comme impliquées dans le développement tumoral des tumeurs gliales (Figure 40).

Trois miARN, miR-124, miR-149 et miR-339-5p, que nous trouvons sous-exprimés dans les gliomes, ciblent PTBP1, protéine fortement exprimée dans les gliomes et notamment dans les glioblastomes. Cette protéine a effectivement été préalablement décrite comme jouant un rôle dans la prolifération des cellules de glioblastomes (Cheung *et al.*, 2009).

Parmi les miARN surexprimés dans les gliomes, on retrouve également miR-17 et miR-20a appartenant au « cluster » miR-17/92 identifié parallèlement à notre étude comme surexprimé dans les glioblastomes par Malzkorn et ses collègues (Malzkorn *et al.*, 2009). Ce « cluster » a pour cible directe la protéine pro-apoptotique Bim, inhibitrice de l'expression de BCL2 (Ventura *et al.* 2008, Inomata *et al.*, 2009) et BCL2 est également la cible directe de miR-139-5p et de miR-15b. L'expression élevée de miR-17 et miR-20a ainsi que l'expression plus faible de miR-139-5p dans les gliomes sont cohérentes avec l'observation d'une expression plus élevée de la protéine BCL2 dans nos échantillons indiquant un effet anti-apoptotique potentiel de ces miARN. Concernant miR-15b, nous soulignons une

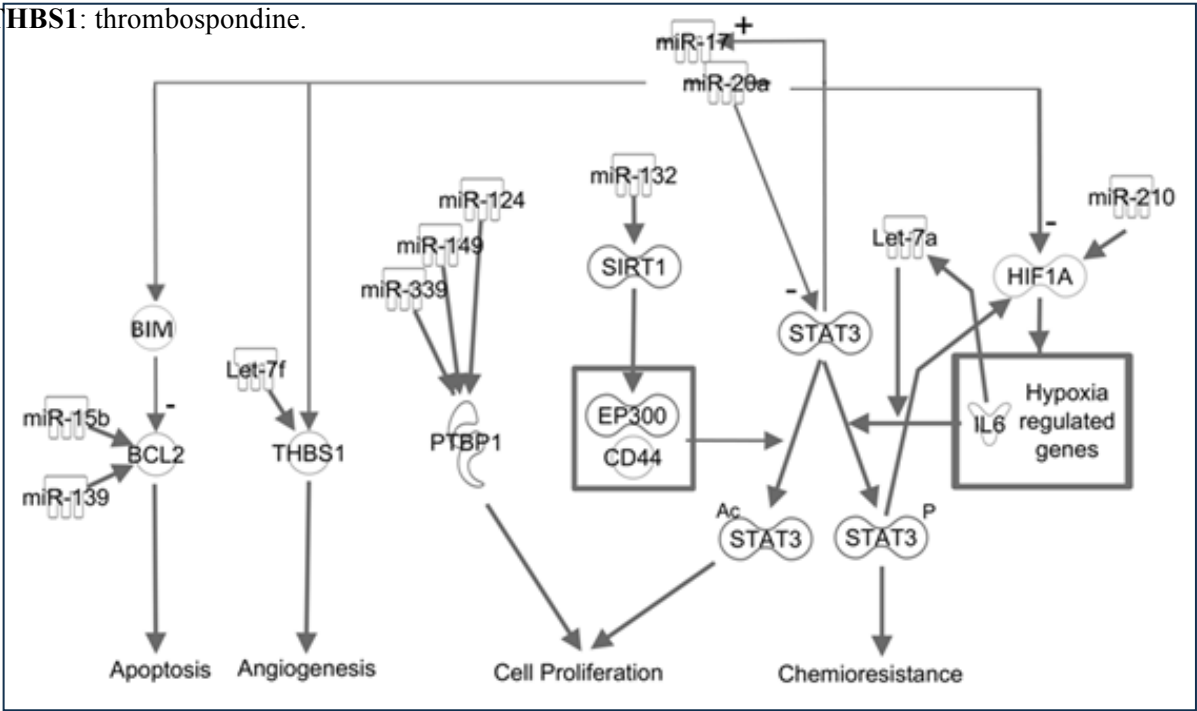
surexpression de ce miARN dans les gliomes qui semblerait indiquer que son rôle dans la régulation post-transcriptionnelle de BCL2 semble moins évident que pour les trois autres miARN précédemment cités.

Une autre cible du « cluster » miR-17/92 décrite est la protéine anti-angiogénique THBS1, cible également de let-7f et miR-21, miARN surexprimés dans les gliomes. On observe cependant une baisse d'expression au niveau protéique seulement pour les oligodendrogliomes qui pourrait être expliquée par le fait que le taux en ARNm dans ces tumeurs est déjà faible alors qu'il est élevé pour les glioblastomes.

Une des protéines clés impliquée dans ce réseau fonctionnel est le facteur de transcription STAT3, que nous trouvons surexprimée dans les glioblastomes, en accord avec des résultats décrits récemment par Chen et ses collègues (Chen *et al.*, 2010). Cette protéine entre dans un système de régulation en boucle avec le « cluster » miR-17/92 puisque elle est d'une part la cible de miR-17 et miR-20a et elle contrôle d'autre part positivement l'expression de ce « cluster » (Brock *et al.*, 2009; Foshay *et al.*, 2009). L'activation de ce facteur de transcription STAT3 est réalisée par IL6, décrite récemment dans la littérature comme stimulée en hypoxie et dont l'expression est élevée dans les glioblastomes. Une fois activé, STAT3 permet de stabiliser HIF1 α induisant une surexpression de miR-210 (Camps *et al.*, 2008 ; Nilsson *et al.*, 2010), ce qui est cohérent avec l'expression un peu plus élevée de ce miARN que l'on retrouve dans les glioblastomes. Dans certaines cellules malignes, les cholangiocytes, il a été montré qu'une augmentation de la phosphorylation de cette protéine STAT3 est initiée par une surexpression de let-7a, elle-même due à une augmentation de l'expression de IL6 dans ces cellules (Meng *et al.*, 2007). STAT3 peut être activée suite à son acétylation impliquant CD44 et EP300, elle-même inactivée par SIRT1 (Lee *et al.*, 2009a). Ayant montré que CD44 est fortement exprimée dans nos échantillons de glioblastomes alors que SIRT1 est plus faible dans ces échantillons, il semblerait que STAT3 soit activée par acétylation dans les glioblastomes. Nous envisageons donc de quantifier l'expression de la protéine STAT3 acétylée dans ces échantillons. L'ensemble de ces voies sont schématisées sur la figure 40.

Figure 40 : Rationalisation des fonctions des miARN d'intérêt dans le développement tumoral des gliomes et interaction avec leurs protéines cibles. *Discussion et perspectives*

CL2: B-cell CLL/lymphoma 2 ; **EP300** : E1A binding protein p300; **HIF1 α** : Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit ; **IL6** : Interleukine 6 ; **PTBP1**: Polypyrimidine tract binding protein 1; **SIRT1**: Sirtuin 1; **STAT3**: Signal transducer and activator of transcription 3 (Ac: acétylé; P: phosphorylé); **THBS1**: thrombospondine.



Nous nous sommes également intéressés aux voies métaboliques impliquant SIRT1, IDH1 et MDH1, protéines que nous trouvons dérégulées dans les gliomes. Ces voies sont présentées sur la figure 41.

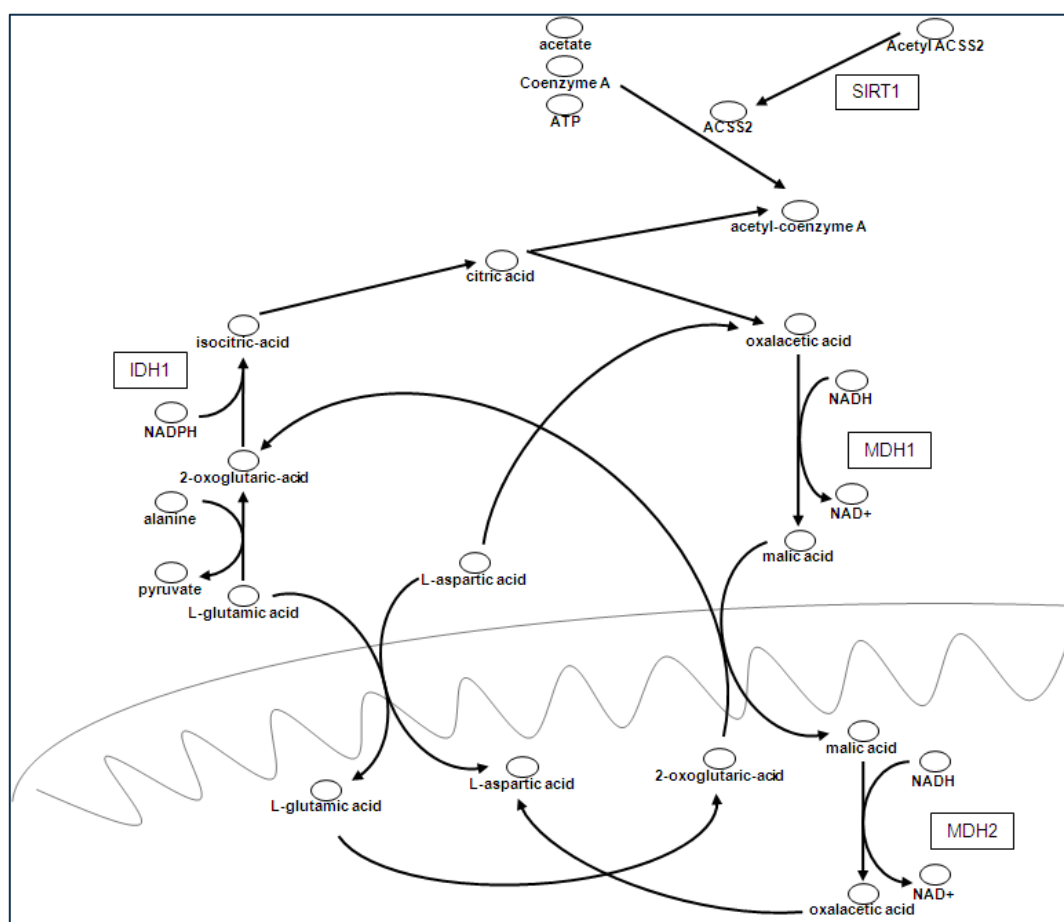
SIRT1 possède également un rôle d'activateur de l'acétyl-CoA synthetase (ACSS2) en jouant sur sa désacétylation. L'absence que nous observons de cette protéine SIRT1 dans les gliomes entraînerait l'arrêt de production de l'acétyl-CoA dans le cytosol par cette réaction catalysée par ACSS2. Ce métabolite étant essentiel à la cellule, un autre moyen engage la voie métabolique initiée par la transamination entre le pyruvate et le glutamate (Belfiore et Iannello, 1995). Cette voie fait intervenir IDH1 qui est la forme cytosolique de l'isocitrate déshydrogénase et qui produit de l'isocitrate à partir d'alpha-cétoglutarate. Parallèlement à la production d'acetyl-CoA, cette voie permet également la production d'oxaloacétate qui est un substrat de l'enzyme MDH1. Une mutation de IDH1, comme retrouvée dans les

oligodendrogliomes et glioblastomes secondaires (Balss *et al.*, 2008), pourrait entraîner une augmentation du pool cytosolique de l'alphacétoglutarate, métabolite impliqué dans la navette malate-aspartate entre la mitochondrie et le cytosol. Cette navette joue un rôle capital car elle permet l'oxydation du NADH cytosolique. MDH1 est également impliqué dans cette navette puisqu'il s'agit de la forme extramitochondriale de la malate déshydrogénase. Nous avons mis en évidence une expression plus faible de cette protéine dans les gliomes, cette dérégulation pouvant être corrélée à une expression plus forte dans ces tumeurs des miARN miR-15b, miR-16, miR-26b et miR-126 ciblant l'ARNm codant pour cette protéine.

De plus, il est connu que la translocation nucléaire et l'activation de p53 dans un contexte non tumoral sont activées par MDH1 et réprimées par MDM2 (Lee *et al.*, 2009b). Une expression dans les gliomes plus faible de MDH1 et plus forte de MDM2 pourrait donc empêcher l'activation de p53 et ainsi permettre le développement tumoral.

En conclusion, les dérégulations d'expression des protéines SIRT1, IDH1 et MDH1 dans les gliomes pourraient interférer dans la production d'acétyl-CoA et dans la navette malate-aspartate et avoir donc des conséquences sur la production d'énergie et l'anabolisme de ces tumeurs.

Nous initions au laboratoire des études fonctionnelles axées sur la transfection de cellules de glioblastomes avec des précurseurs ou des inhibiteurs des miARN d'intérêt pour s'assurer de la validité des cibles d'intérêt prédites puisque les cibles auxquelles nous nous sommes intéressés sont des cibles prédites seulement *in silico*. Dans ce sens, quelques études à grande échelle ont été initiées ces dernières années pour mieux comprendre les relations miARN/ARNm/protéines par des méthodes protéiques (SILAC, ITRAQ) et géniques (Baek *et al.*, 2008; Selbach *et al.*, 2008; Taguchi *et al.*, 2008 ; Tan *et al.*, 2009).



V- Les miARN comme outils thérapeutiques ?

Les miARN, au vu de leur rôle de régulateurs d'un grand nombre de voies moléculaires, semblent être des outils thérapeutiques prometteurs dans un certain nombre de pathologies et notamment dans le cancer. De nombreuses études ont été menées à l'heure actuelle *in vitro* et *in vivo* sur l'effet de la modulation du taux des miARN (sous-expression par inhibition ou surexpression par apport de précurseurs) sur un ensemble de mécanismes comme la croissance cellulaire dans le cas du glioblastome ou cancer du sein, l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, etc... (pour revue Stenvang *et al.*, 2008). Concernant la sous-expression, deux types d'inhibiteurs des miARN sont décrits pour une telle modulation, les LNA-antimiR et les 2'-O-Me-antimiR. La première catégorie consiste en des oligonucléotides constitués de « locked nucleic acids », qui sont des analogues des ARN dont le ribose est

bloqué par un pont méthylène entre le 2'O et le 4'C alors que la deuxième catégorie consiste en des oligonucléotides dont les bases sont modifiées en 2' par des groupements O-méthyle. Le principal intérêt de ces types d'oligonucléotides est la forte spécificité d'interaction avec le miARN ciblé ainsi que la résistance aux RNAses présentes dans le sang.

Quant à la surexpression, elle est possible par différentes techniques (pour revue Love *et al.*, 2008) développées pour surmonter des inconvénients comme la dégradation par les RNAses sanguines ou l'immunogénicité de l'ARN introduit. Ces techniques sont par exemple l'introduction de vecteurs viraux permettant une expression constitutive de miARN ou siARN ou leur encapsulation dans des nanoparticules ou des liposomes (Wang et Wu, 2009).

Nous avons montré tout au long de ce projet que les profils d'expression des miARN montrent des différences remarquables entre les tissus de différentes tumeurs cérébrales et le tissu cérébral non tumoral.

De ce fait, les miARN peuvent être exploités comme des marqueurs diagnostiques puissants pour une classification moléculaire des tumeurs du système nerveux central, notamment pour la distinction des gliomes de différents grades, les glioblastomes et oligodendrogliomes.

Ces connaissances ainsi que les mécanismes d'action de ces miARN d'intérêt dans la régulation traductionnelle et le développement tumoral que nous avons décrits sont novateurs pour ce type de tumeurs. Les modifications des profils des miARN ainsi que les altérations notables de l'expression de protéines majeures dans le métabolisme cellulaire apportent une description moléculaire qui permet de proposer des interprétations quant aux particularités physiopathologiques de ces tumeurs.

L'ensemble de ces données suggère enfin que les miARN représentent un potentiel thérapeutique intéressant contre les cancers par modulation de leur expression cellulaire.

Bibliographie

- Abe, N., T. Watanabe, Y. Suzuki, N. Matsumoto, T. Masaki, T. Mori, M. Sugiyama, G. Chiappetta, A. Fusco, and Y. Atomi.** (2003) An increased high-mobility group A2 expression level is associated with malignant phenotype in pancreatic exocrine tissue. *Br J Cancer*. 89:2104-9.
- Abeloos, L., J. Brotschi, and O. De Witte.** (2007) [Management of low-grade glioma: a retrospective study concerning 201 patients]. *Neurochirurgie*. 53:277-83.
- Akao, Y., Y. Nakagawa, and T. Naoe.** (2006) let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull*. 29:903-6.
- Ambs, S., R.L. Prueitt, M. Yi, R.S. Hudson, T.M. Howe, F. Petrocca, T.A. Wallace, C.G. Liu, S. Volinia, G.A. Calin, H.G. Yfantis, R.M. Stephens, and C.M. Croce.** (2008) Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res*. 68:6162-70.
- Aravin, A.A., N.M. Naumova, A.V. Tulin, V.V. Vagin, Y.M. Rozovsky, and V.A. Gvozdev.** (2001) Double-stranded RNA-mediated silencing of genomic tandem repeats and transposable elements in the *D. melanogaster* germline. *Curr Biol*. 11:1017-27.
- Aravin, A.A., M. Lagos-Quintana, A. Yalcin, M. Zavolan, D. Marks, B. Snyder, T. Gaasterland, J. Meyer, and T. Tuschl.** (2003) The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell*. 5:337-50.
- Aravin, A., D. Gaidatzis, S. Pfeffer, M. Lagos-Quintana, P. Landgraf, N. Iovino, P. Morris, M.J. Brownstein, S. Kuramochi-Miyagawa, T. Nakano, M. Chien, J.J. Russo, J. Ju, R. Sheridan, C. Sander, M. Zavolan, and T. Tuschl.** (2006) A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*. 442:203-7.
- Asangani, I.A., S.A. Rasheed, D.A. Nikolova, J.H. Leupold, N.H. Colburn, S. Post, and H. Allgayer.** (2008) MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 27:2128-36.
- Avissar, M., B.C. Christensen, K.T. Kelsey, and C.J. Marsit.** (2009) MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 15:2850-5.
- Baek, D., J. Villen, C. Shin, F.D. Camargo, S.P. Gygi, and D.P. Bartel.** (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature*. 455:64-71.
- Bagga, S., J. Bracht, S. Hunter, K. Massirer, J. Holtz, R. Eachus, and A.E. Pasquinelli.** (2005) Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*. 122:553-63.
- Baia, G.S., A.L. Slocum, J.D. Hyer, A. Misra, N. Sehati, S.R. VandenBerg, B.G. Feuerstein, D.F. Deen, M.W. McDermott, and A. Lal.** (2006) A genetic strategy to overcome the senescence of primary meningioma cell cultures. *J Neurooncol*. 78:113-21.
- Balss, J., J. Meyer, W. Mueller, A. Korshunov, C. Hartmann, and A. von Deimling.** (2008) Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol*. 116:597-602.
- Barbaro, N.M., P.H. Gutin, C.B. Wilson, G.E. Sheline, E.B. Boldrey, and W.M. Wara.** (1987) Radiation therapy in the treatment of partially resected meningiomas. *Neurosurgery*. 20:525-8.

- Bartel, D.P.** (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116:281-97.
- Bartel, D.P.** (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 136:215-33.
- Baskerville, S., and D.P. Bartel.** (2005) Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *Rna*. 11:241-7.
- Beduneau, A., P. Saulnier, and J.P. Benoit.** (2007) Active targeting of brain tumors using nanocarriers. *Biomaterials*. 28:4947-67.
- Belfiore, F., and S. Iannello.** (1995) Fatty acid synthesis from glutamate in the adipose tissue of normal subjects and obese patients: an enzyme study. *Biochem Mol Med*. 54:19-25.
- Berezikov, E., W.J. Chung, J. Willis, E. Cuppen, and E.C. Lai.** (2007) Mammalian mirtron genes. *Mol Cell*. 28:328-36.
- Bernstein, E., A.A. Caudy, S.M. Hammond, and G.J. Hannon.** (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 409:363-6.
- Betel, D., M. Wilson, A. Gabow, D.S. Marks, and C. Sander.** (2008) The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res*. 36:D149-53.
- Bitomsky, N., N. Wethkamp, R. Marikkannu, and K.H. Klempnauer.** (2008) siRNA-mediated knockdown of Pcd4 expression causes upregulation of p21(Waf1/Cip1) expression. *Oncogene*. 27:4820-9.
- Bleeker, F.E., S. Lamba, S. Leenstra, D. Troost, T. Hulsebos, W.P. Vandertop, M. Frattini, F. Molinari, M. Knowles, A. Cerrato, M. Rodolfo, A. Scarpa, L. Felicioni, F. Buttitta, S. Malatesta, A. Marchetti, and A. Bardelli.** (2009) IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Hum Mutat*. 30:7-11.
- Boland, A., F. Triteschler, S. Heimstadt, E. Izaurralde, and O. Weichenrieder.** (2010) Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein. *EMBO Rep*. 11:522-7.
- Boominathan, L.** (2010) The tumor suppressors p53, p63, and p73 are regulators of microRNA processing complex. *PLoS One*. 5:e10615.
- Bourguignon, L.Y., C.C. Spevak, G. Wong, W. Xia, and E. Gilad.** (2009) Hyaluronan-CD44 interaction with protein kinase C(epsilon) promotes oncogenic signaling by the stem cell marker Nanog and the Production of microRNA-21, leading to down-regulation of the tumor suppressor protein PDCD4, anti-apoptosis, and chemotherapy resistance in breast tumor cells. *J Biol Chem*. 284:26533-46.
- Bousquet, M., C. Quelen, R. Rosati, V. Mansat-De Mas, R. La Starza, C. Bastard, E. Lippert, P. Talmant, M. Lafage-Pochitaloff, D. Leroux, C. Gervais, F. Viguie, J.L. Lai, C. Terre, B. Beverlo, C. Sambani, A. Hagemeyer, P. Marynen, G. Delsol, N. Dastugue, C. Mecucci, and P. Brousset.** (2008) Myeloid cell differentiation arrest by miR-125b-1 in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with the t(2;11)(p21;q23) translocation. *J Exp Med*. 205:2499-506.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-54.

- Brendle, A., H. Lei, A. Brandt, R. Johansson, K. Enquist, R. Henriksson, K. Hemminki, P. Lenner, and A. Forsti.** (2008) Polymorphisms in predicted microRNA-binding sites in integrin genes and breast cancer: ITGB4 as prognostic marker. *Carcinogenesis*. 29:1394-9.
- Bregues, M., D. Teixeira, and R. Parker.** (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science*. 310:486-9.
- Brennecke, J., D.R. Hipfner, A. Stark, R.B. Russell, and S.M. Cohen.** (2003) bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*. 113:25-36.
- Brennecke, J., A. Stark, R.B. Russell, and S.M. Cohen.** (2005) Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 3:e85.
- Bretscher, A., K. Edwards, and R.G. Fehon.** (2002) ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:586-99.
- Brock, M., M. Trenkmann, R.E. Gay, B.A. Michel, S. Gay, M. Fischler, S. Ulrich, R. Speich, and L.C. Huber.** (2009) Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circ Res*. 104:1184-91.
- Brosh, R., R. Shalgi, A. Liran, G. Landan, K. Korotayev, G.H. Nguyen, E. Enerly, H. Johnsen, Y. Buganim, H. Solomon, I. Goldstein, S. Madar, N. Goldfinger, A.L. Borresen-Dale, D. Ginsberg, C.C. Harris, Y. Pilpel, M. Oren, and V. Rotter.** (2008) p53-Repressed miRNAs are involved with E2F in a feed-forward loop promoting proliferation. *Mol Syst Biol.* 4:229.
- Brownawell, A.M., and I.G. Macara.** (2002) Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *J Cell Biol.* 156:53-64.
- Brueckner, B., C. Stresemann, R. Kuner, C. Mund, T. Musch, M. Meister, H. Sultmann, and F. Lyko.** (2007) The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res.* 67:1419-23.
- Bueno, M.J., M. Gomez de Cedron, U. Laresgoiti, J. Fernandez-Piqueras, A.M. Zubiaga, and M. Malumbres.** (2010) Multiple E2F-induced microRNAs prevent replicative stress in response to mitogenic signaling. *Mol Cell Biol.* 30:2983-95.
- Bush, J.A., and G. Li.** (2003) The role of Bcl-2 family members in the progression of cutaneous melanoma. *Clin Exp Metastasis*. 20:531-9.
- Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen.** (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*. 10:1957-66.
- Calin, G.A., C.D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich, and C.M. Croce.** (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:15524-9.
- Calin, G.A., C. Sevignani, C.D. Dumitru, T. Hyslop, E. Noch, S. Yendamuri, M. Shimizu, S. Rattan, F. Bullrich, M. Negrini, and C.M. Croce.** (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:2999-3004.

- Calin, G.A., A. Cimmino, M. Fabbri, M. Ferracin, S.E. Wojcik, M. Shimizu, C. Taccioli, N. Zanesi, R. Garzon, R.I. Aqeilan, H. Alder, S. Volinia, L. Rassenti, X. Liu, C.G. Liu, T.J. Kipps, M. Negrini, and C.M. Croce.** (2008) MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:5166-71.
- Camps, C., F.M. Buffa, S. Colella, J. Moore, C. Sotiriou, H. Sheldon, A.L. Harris, J.M. Gleadle, and J. Ragoussis.** (2008) hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 14:1340-8.
- Cao, X., G. Yeo, A.R. Muotri, T. Kuwabara, and F.H. Gage.** (2006) Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 29:77-103.
- Cargioli, T.G., H.C. Ugur, N. Ramakrishna, J. Chan, P.M. Black, and R.S. Carroll.** (2007) Establishment of an in vivo meningioma model with human telomerase reverse transcriptase. *Neurosurgery.* 60:750-9; discussion 759-60.
- Chamberlain, M.C.** (1996) Adjuvant combined modality therapy for malignant meningiomas. *J Neurosurg.* 84:733-6.
- Chan, J.A., A.M. Krichevsky, and K.S. Kosik.** (2005) MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 65:6029-33.
- Chang, T.C., E.A. Wentzel, O.A. Kent, K. Ramachandran, M. Mullendore, K.H. Lee, G. Feldmann, M. Yamakuchi, M. Ferlito, C.J. Lowenstein, D.E. Arking, M.A. Beer, A. Maitra, and J.T. Mendell.** (2007) Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell.* 26:745-52.
- Chang, T.C., D. Yu, Y.S. Lee, E.A. Wentzel, D.E. Arking, K.M. West, C.V. Dang, A. Thomas-Tikhonenko, and J.T. Mendell.** (2008) Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet.* 40:43-50.
- Chen, Y., T. Knosel, G. Kristiansen, A. Pietas, M.E. Garber, S. Matsushashi, I. Ozaki, and I. Petersen.** (2003) Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis. *J Pathol.* 200:640-6.
- Chen, C.Z., L. Li, H.F. Lodish, and D.P. Bartel.** (2004) MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science.* 303:83-6.
- Chen, R.W., L.T. Bemis, C.M. Amato, H. Myint, H. Tran, D.K. Birks, S.G. Eckhardt, and W.A. Robinson.** (2008) Truncation in CCND1 mRNA alters miR-16-1 regulation in mantle cell lymphoma. *Blood.* 112:822-9.
- Chen, Y., and D.H. Gorski.** (2008) Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood.* 111:1217-26.
- Chen, F., Y. Xu, Y. Luo, D. Zheng, Y. Song, K. Yu, H. Li, L. Zhang, W. Zhong, and Y. Ji.** (2010) Down-regulation of Stat3 decreases invasion activity and induces apoptosis of human glioma cells. *J Mol Neurosci.* 40:353-9.
- Chendrimada, T.P., R.I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura, and R. Shiekhattar.** (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 436:740-4.

- Chendrimada, T.P., K.J. Finn, X. Ji, D. Baillat, R.I. Gregory, S.A. Liebhaber, A.E. Pasquinelli, and R. Shiekhattar.** (2007) MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*. 447:823-8.
- Chin, L.J., E. Ratner, S. Leng, R. Zhai, S. Nallur, I. Babar, R.U. Muller, E. Straka, L. Su, E.A. Burki, R.E. Crowell, R. Patel, T. Kulkarni, R. Homer, D. Zeltermann, K.K. Kidd, Y. Zhu, D.C. Christiani, S.A. Belinsky, F.J. Slack, and J.B. Weidhaas.** (2008) A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res.* 68:8535-40.
- Chinnaiyan, A.M., K. O'Rourke, M. Tewari, and V.M. Dixit.** (1995) FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 81:505-12.
- Chiosea, S., E. Jelezcova, U. Chandran, M. Acquafondata, T. McHale, R.W. Sobol, and R. Dhir.** (2006) Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol.* 169:1812-20.
- Chiosea, S., E. Jelezcova, U. Chandran, J. Luo, G. Mantha, R.W. Sobol, and S. Dacic.** (2007) Overexpression of Dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 67:2345-50.
- Cheung, H.C., T. Hai, W. Zhu, K.A. Baggerly, S. Tsavachidis, R. Krahe, and G.J. Cote.** (2009) Splicing factors PTBP1 and PTBP2 promote proliferation and migration of glioma cell lines. *Brain.* 132:2277-88.
- Ciafre, S.A., S. Galardi, A. Mangiola, M. Ferracin, C.G. Liu, G. Sabatino, M. Negrini, G. Maira, C.M. Croce, and M.G. Farace.** (2005) Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 334:1351-8.
- Cimmino, A., G.A. Calin, M. Fabbri, M.V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S.E. Wojcik, R.I. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C.G. Liu, T.J. Kipps, M. Negrini, and C.M. Croce.** (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:13944-9.
- Colella, S., L. Shen, K.A. Baggerly, J.P. Issa, and R. Krahe.** (2003) Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques.* 35:146-50.
- Cosentino, G.P., S. Venkatesan, F.C. Serluca, S.R. Green, M.B. Mathews, and N. Sonenberg.** (1995) Double-stranded-RNA-dependent protein kinase and TAR RNA-binding protein form homo- and heterodimers in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:9445-9.
- Costinean, S., N. Zanesi, Y. Pekarsky, E. Tili, S. Volinia, N. Heerema, and C.M. Croce.** (2006) Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:7024-9.
- Cougot, N., S. Babajko, and B. Seraphin.** (2004) Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol.* 165:31-40.
- Coultas, L., and A. Strasser.** (2003) The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol.* 13:115-23.
- Daumas-Duport, C., F. Beuvon, P. Varlet, and C. Fallet-Bianco.** (2000) [Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]. *Ann Pathol.* 20:413-28.

- de Keizer, R.J., and J.W. Smit.** (2004) Mifepristone treatment in patients with surgically incurable sphenoid-ridge meningioma: a long-term follow-up. *Eye (Lond)*. 18:954-8.
- Dews, M., A. Homayouni, D. Yu, D. Murphy, C. Seignani, E. Wentzel, E.E. Furth, W.M. Lee, G.H. Enders, J.T. Mendell, and A. Thomas-Tikhonenko.** (2006) Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet*. 38:1060-5.
- Diaz, R., J. Silva, J.M. Garcia, Y. Lorenzo, V. Garcia, C. Pena, R. Rodriguez, C. Munoz, F. Garcia, F. Bonilla, and G. Dominguez.** (2008) Deregulated expression of miR-106a predicts survival in human colon cancer patients. *Genes Chromosomes Cancer*. 47:794-802.
- Di Cello, F., J. Hillion, A. Hristov, L.J. Wood, M. Mukherjee, A. Schuldenfrei, J. Kowalski, R. Bhattacharya, R. Ashfaq, and L.M. Resar.** (2008) HMGA2 participates in transformation in human lung cancer. *Mol Cancer Res*. 6:743-50.
- Di Cristofano, A., and P.P. Pandolfi.** (2000) The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell*. 100:387-90.
- Diederichs, S., and D.A. Haber.** (2007) Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*. 131:1097-108.
- Djuranovic, S., M.K. Zinchenko, J.K. Hur, A. Nahvi, J.L. Brunelle, E.J. Rogers, and R. Green.** (2010) Allosteric regulation of Argonaute proteins by miRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 17:144-50.
- Doench, J.G., and P.A. Sharp.** (2004) Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*. 18:504-11.
- Dong, J.T.** (2001) Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 20:173-93.
- Dostie, J., Z. Mourelatos, M. Yang, A. Sharma, and G. Dreyfuss.** (2003) Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *Rna*. 9:180-6.
- Dropcho, E.J., and S.J. Soong.** (1996) The prognostic impact of prior low grade histology in patients with anaplastic gliomas: a case-control study. *Neurology*. 47:684-90.
- Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang.** (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*. 102:33-42.
- Duan, R., C. Pak, and P. Jin.** (2007) Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. *Hum Mol Genet*. 16:1124-31.
- Dumanski, J.P., G.A. Rouleau, M. Nordenskjold, and V.P. Collins.** (1990) Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Res*. 50:5863-7.
- Eis, P.S., W. Tam, L. Sun, A. Chadburn, Z. Li, M.F. Gomez, E. Lund, and J.E. Dahlberg.** (2005) Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:3627-32.
- Eskes, R., S. Desagher, B. Antonsson, and J.C. Martinou.** (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol*. 20:929-35.
- Esteller, M., J. Garcia-Foncillas, E. Andion, S.N. Goodman, O.F. Hidalgo, V. Vanaclocha, S.B. Baylin, and J.G. Herman.** (2000) Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med*. 343:1350-4.

- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, and E. Izaurralde.** (2007) P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:9-22.
- Eystathiou, T., E.K. Chan, S.A. Tenenbaum, J.D. Keene, K. Griffith, and M.J. Fritzler.** (2002) A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell.* 13:1338-51.
- Fan, Q.W., Z.A. Knight, D.D. Goldenberg, W. Yu, K.E. Mostov, D. Stokoe, K.M. Shokat, and W.A. Weiss.** (2006) A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell.* 9:341-9.
- Fasanaro, P., Y. D'Alessandra, V. Di Stefano, R. Melchionna, S. Romani, G. Pompilio, M.C. Capogrossi, and F. Martelli.** (2008) MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem.* 283:15878-83.
- Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg.** (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 9:102-14.
- Fiore, R., S. Khudayberdiev, M. Christensen, G. Siegel, S.W. Flavell, T.K. Kim, M.E. Greenberg, and G. Schratt.** (2009) Mef2-mediated transcription of the miR379-410 cluster regulates activity-dependent dendritogenesis by fine-tuning Pumilio2 protein levels. *Embo J.* 28:697-710.
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello.** (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391:806-11.
- Foshay, K.M., and G.I. Gallicano.** (2009) miR-17 family miRNAs are expressed during early mammalian development and regulate stem cell differentiation. *Dev Biol.* 326:431-43.
- Friedman, H.S., T. Kerby, and H. Calvert.** (2000) Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res.* 6:2585-97.
- Friedman, R.C., K.K. Farh, C.B. Burge, and D.P. Bartel.** (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19:92-105.
- Frommer, M., L.E. McDonald, D.S. Millar, C.M. Collis, F. Watt, G.W. Grigg, P.L. Molloy, and C.L. Paul.** (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:1827-31.
- Furnari, F.B., T. Fenton, R.M. Bachoo, A. Mukasa, J.M. Stommel, A. Stegh, W.C. Hahn, K.L. Ligon, D.N. Louis, C. Brennan, L. Chin, R.A. DePinho, and W.K. Cavenee.** (2007) Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes Dev.* 21:2683-710.
- Gaidatzis, D., E. van Nimwegen, J. Hausser, and M. Zavolan.** (2007) Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. *BMC Bioinformatics.* 8:69.
- Gao, Y., Y. He, J. Ding, K. Wu, B. Hu, Y. Liu, Y. Wu, B. Guo, Y. Shen, D. Landi, S. Landi, Y. Zhou, and H. Liu.** (2009) An insertion/deletion polymorphism at miRNA-122-binding site in the interleukin-1 α 3' untranslated region confers risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis.* 30:2064-9.

- Garcion, E., A. Lamprecht, B. Heurtault, A. Paillard, A. Aubert-Pouessel, B. Denizot, P. Menei, and J.P. Benoit.** (2006) A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Mol Cancer Ther.* 5:1710-22.
- Garzon, R., G.A. Calin, and C.M. Croce.** (2009) MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med.* 60:167-79.
- Gaur, A., D.A. Jewell, Y. Liang, D. Ridzon, J.H. Moore, C. Chen, V.R. Ambros, and M.A. Israel.** (2007) Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res.* 67:2456-68.
- Gay, E.** (2004) Le phénotype d'invasion des méningiomes : importance clinique, approches moléculaires et cellulaires. *Thèse de l'Université Joseph Fourier*
- Gebauer, F., and M.W. Hentze.** (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:827-35.
- Girard, A., R. Sachidanandam, G.J. Hannon, and M.A. Carmell.** (2006) A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature.* 442:199-202
- Goodwin, J.W., J. Crowley, H.J. Eyre, B. Stafford, K.A. Jaeckle, and J.J. Townsend.** (1993) A phase II evaluation of tamoxifen in unresectable or refractory meningiomas: a Southwest Oncology Group study. *J Neurooncol.* 15:75-7.
- Gordon, G.J., R.V. Jensen, L.L. Hsiao, S.R. Gullans, J.E. Blumenstock, S. Ramaswamy, W.G. Richards, D.J. Sugarbaker, and R. Bueno.** (2002) Translation of microarray data into clinically relevant cancer diagnostic tests using gene expression ratios in lung cancer and mesothelioma. *Cancer Res.* 62:4963-7.
- Gregory, R.I., K.P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch, and R. Shiekhattar.** (2004) The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 432:235-40.
- Gregory, R.I., T.P. Chendrimada, N. Cooch, and R. Shiekhattar.** (2005) Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell.* 123:631-40.
- Griffiths-Jones, S.** (2004) The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.* 32:D109-11.
- Griffiths-Jones, S., R.J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman, and A.J. Enright.** (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 34:D140-4.
- Griffiths-Jones, S., H.K. Saini, S. van Dongen, and A.J. Enright.** (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 36:D154-8.
- Grimson, A., K.K. Farh, W.K. Johnston, P. Garrett-Engele, L.P. Lim, and D.P. Bartel.** (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell.* 27:91-105.
- Grivna, S.T., E. Beyret, Z. Wang, and H. Lin.** (2006) A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev.* 20:1709-14.
- Grunberg, S.M., M.H. Weiss, I.M. Spitz, J. Ahmadi, A. Sadun, C.A. Russell, L. Lucci, and L.L. Stevenson.** (1991) Treatment of unresectable meningiomas with the antiprogesterone agent mifepristone. *J Neurosurg.* 74:861-6.

- Grunberg, S.M., M.H. Weiss, C.A. Russell, I.M. Spitz, J. Ahmadi, A. Sadun, and R. Sitruk-Ware. (2006) Long-term administration of mifepristone (RU486): clinical tolerance during extended treatment of meningioma. *Cancer Invest.* 24:727-33.
- Gutmann, D.H., J. Donahoe, A. Perry, N. Lemke, K. Gorse, K. Kittiniyom, S.A. Rempel, J.A. Gutierrez, and I.F. Newsham. (2000) Loss of DAL-1, a protein 4.1-related tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningiomas. *Hum Mol Genet.* 9:1495-500.
- Gwizdek, C., B. Ossareh-Nazari, A.M. Brownawell, A. Doglio, E. Bertrand, I.G. Macara, and C. Dargemont. (2003) Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *J Biol Chem.* 278:5505-8.
- Han, J., Y. Lee, K.H. Yeom, J.W. Nam, I. Heo, J.K. Rhee, S.Y. Sohn, Y. Cho, B.T. Zhang, and V.N. Kim. (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell.* 125:887-901.
- Harfe, B.D. (2005) MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev.* 15:410-5.
- Hayashita, Y., H. Osada, Y. Tatematsu, H. Yamada, K. Yanagisawa, S. Tomida, Y. Yatabe, K. Kawahara, Y. Sekido, and T. Takahashi. (2005) A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 65:9628-32.
- He, H., K. Jazdzewski, W. Li, S. Liyanarachchi, R. Nagy, S. Volinia, G.A. Calin, C.G. Liu, K. Franssila, S. Suster, R.T. Kloos, C.M. Croce, and A. de la Chapelle. (2005a) The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:19075-80.
- He, L., J.M. Thomson, M.T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S.W. Lowe, G.J. Hannon, and S.M. Hammond. (2005b) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature.* 435:828-33.
- Henry-Mowatt, J., C. Dive, J.C. Martinou, and D. James. (2004) Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene.* 23:2850-60.
- Heurtault, B., P. Saulnier, B. Pech, J.E. Proust, and J.P. Benoit. (2002) A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. *Pharm Res.* 19:875-80.
- Hoang-Xuan, K., J. He, S. Huguet, K. Mokhtari, Y. Marie, M. Kujas, P. Leuraud, L. Capelle, J.Y. Delattre, J. Poirier, P. Broet, and M. Sanson. (2001) Molecular heterogeneity of oligodendrogliomas suggests alternative pathways in tumor progression. *Neurology.* 57:1278-81.
- Hoang-Xuan, K., A. Idbaih, K. Mokhtari, and M. Sanson. (2005) [Towards a molecular classification of gliomas]. *Bull Cancer.* 92:310-6.
- Houbaviy, H.B., M.F. Murray, and P.A. Sharp. (2003) Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell.* 5:351-8.
- Hu, Z., J. Chen, T. Tian, X. Zhou, H. Gu, L. Xu, Y. Zeng, R. Miao, G. Jin, H. Ma, Y. Chen, and H. Shen. (2008) Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest.* 118:2600-8.

- Hua, Z., Q. Lv, W. Ye, C.K. Wong, G. Cai, D. Gu, Y. Ji, C. Zhao, J. Wang, B.B. Yang, and Y. Zhang. (2006) MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS One*. 1:e116.
- Humphreys, D.T., B.J. Westman, D.I. Martin, and T. Preiss. (2005) MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:16961-6.
- Hunter, M.P., N. Ismail, X. Zhang, B.D. Aguda, E.J. Lee, L. Yu, T. Xiao, J. Schafer, M.L. Lee, T.D. Schmittgen, S.P. Nana-Sinkam, D. Jarjoura, and C.B. Marsh. (2008) Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*. 3:e3694.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, A.E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl, and P.D. Zamore. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 293:834-8.
- Hutvagner, G., and M.J. Simard. (2008) Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9:22-32.
- Ichimura, K., D.M. Pearson, S. Kocialkowski, L.M. Backlund, R. Chan, D.T. Jones, and V.P. Collins. (2009) IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol*. 11:341-7.
- Igney, F.H., and P.H. Krammer. (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2:277-88.
- Ingelfinger, D., D.J. Arndt-Jovin, R. Luhrmann, and T. Achsel. (2002) The human LSml-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci. *Rna*. 8:1489-501.
- Inomata, M., H. Tagawa, Y.M. Guo, Y. Kameoka, N. Takahashi, and K. Sawada. (2009) MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood*. 113:396-402.
- Iorio, M.V., M. Ferracin, C.G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Menard, J.P. Palazzo, A. Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I. Nenci, G.A. Calin, P. Querzoli, M. Negrini, and C.M. Croce. (2005) MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*. 65:7065-70.
- Irizarry, R.A., B.M. Bolstad, F. Collin, L.M. Cope, B. Hobbs, and T.P. Speed. (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*. 31:e15.
- Jaaskelainen, J., M. Haltia, and A. Servo. (1986) Atypical and anaplastic meningiomas: radiology, surgery, radiotherapy, and outcome. *Surg Neurol*. 25:233-42.
- Jazdzewski, K., E.L. Murray, K. Franssila, B. Jarzab, D.R. Schoenberg, and A. de la Chapelle. (2008) Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:7269-74.
- John, B., A.J. Enright, A. Aravin, T. Tuschl, C. Sander, and D.S. Marks. (2004) Human MicroRNA targets. *PLoS Biol*. 2:e363.
- Johnson, S.M., H. Grosshans, J. Shingara, M. Byrom, R. Jarvis, A. Cheng, E. Labourier, K.L. Reinert, D. Brown, and F.J. Slack. (2005) RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 120:635-47.

- Jones-Rhoades, M.W., D.P. Bartel, and B. Bartel.** (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol.* 57:19-53.
- Kalamarides, M., M. Niwa-Kawakita, H. Leblois, V. Abramowski, M. Perricaudet, A. Janin, G. Thomas, D.H. Gutmann, and M. Giovannini.** (2002) Nf2 gene inactivation in arachnoidal cells is rate-limiting for meningioma development in the mouse. *Genes Dev.* 16:1060-5.
- Kapsimali, M., W.P. Kloosterman, E. de Bruijn, F. Rosa, R.H. Plasterk, and S.W. Wilson.** (2007) MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system. *Genome Biol.* 8:R173.
- Karube, Y., H. Tanaka, H. Osada, S. Tomida, Y. Tatematsu, K. Yanagisawa, Y. Yatabe, J. Takamizawa, S. Miyoshi, T. Mitsudomi, and T. Takahashi.** (2005) Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci.* 96:111-5.
- Kawamata, T., H. Seitz, and Y. Tomari.** (2009) Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat Struct Mol Biol.* 16:953-60.
- Ke, H., J. Pei, Z. Ni, H. Xia, H. Qi, T. Woods, A. Kelekar, and W. Tao.** (2004) Putative tumor suppressor Lats2 induces apoptosis through downregulation of Bcl-2 and Bcl-x(L). *Exp Cell Res.* 298:329-38.
- Kean, K.M.** (2003) The role of mRNA 5'-noncoding and 3'-end sequences on 40S ribosomal subunit recruitment, and how RNA viruses successfully compete with cellular mRNAs to ensure their own protein synthesis. *Biol Cell.* 95:129-39.
- Kedersha, N., and P. Anderson.** (2002) Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans.* 30:963-9.
- Kedersha, N., G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M.J. Fritzler, D. Scheuner, R.J. Kaufman, D.E. Golan, and P. Anderson.** (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol.* 169:871-84.
- Kehlenbach, R.H., A. Dickmanns, A. Kehlenbach, T. Guan, and L. Gerace.** (1999) A role for RanBP1 in the release of CRM1 from the nuclear pore complex in a terminal step of nuclear export. *J Cell Biol.* 145:645-57.
- Kertesz, M., N. Iovino, U. Unnerstall, U. Gaul, and E. Segal.** (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet.* 39:1278-84.
- Ketting, R.F., S.E. Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G.J. Hannon, and R.H. Plasterk.** (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15:2654-9.
- Khvorova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena.** (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 115:209-16.
- Kim, V.N., J. Han, and M.C. Siomi.** (2009) Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:126-39.
- Kirches, E., J. Grunewald, P. von Bossanyi, R. Szibor, I. Plate, S. Kruger, M. Warich-Kirches, and K. Dietzmann.** (2001) Expression of matrix metalloproteinases in a series of 12 meningiomas. *Clin Neuropathol.* 20:26-30.

- Kiriakidou, M., P.T. Nelson, A. Kouranov, P. Fitziev, C. Bouyioukos, Z. Mourelatos, and A. Hatzigeorgiou. (2004) A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev.* 18:1165-78.
- Kiriakidou, M., G.S. Tan, S. Lamprinaki, M. De Planell-Saguer, P.T. Nelson, and Z. Mourelatos. (2007) An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell.* 129:1141-51.
- Kluiver, J., S. Poppema, D. de Jong, T. Blokzijl, G. Harms, S. Jacobs, B.J. Kroesen, and A. van den Berg. (2005) BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol.* 207:243-9.
- Kluiver, J., E. Haralambieva, D. de Jong, T. Blokzijl, S. Jacobs, B.J. Kroesen, S. Poppema, and A. van den Berg. (2006) Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 45:147-53.
- Krek, A., D. Grun, M.N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E.J. Epstein, P. MacMenamin, I. da Piedade, K.C. Gunsalus, M. Stoffel, and N. Rajewsky. (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 37:495-500.
- Kuehbach, A., C. Urbich, A.M. Zeiher, and S. Dimmeler. (2007) Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res.* 101:59-68.
- Kulshreshtha, R., M. Ferracin, S.E. Wojcik, R. Garzon, H. Alder, F.J. Agosto-Perez, R. Davuluri, C.G. Liu, C.M. Croce, M. Negrini, G.A. Calin, and M. Ivan. (2007) A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol.* 27:1859-67.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel, and T. Tuschl. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 294:853-8.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel, and T. Tuschl. (2002) Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol.* 12:735-9.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, J. Meyer, A. Borkhardt, and T. Tuschl. (2003) New microRNAs from mouse and human. *Rna.* 9:175-9.
- Lamprecht, A., and J.P. Benoit. (2006) Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *J Control Release.* 112:208-13.
- Landi, D., F. Gemignani, A. Naccarati, B. Pardini, P. Vodicka, L. Vodickova, J. Novotny, A. Forsti, K. Hemminki, F. Canzian, and S. Landi. (2008) Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 29:579-84.
- Laperriere, N., L. Zuraw, and G. Cairncross. (2002) Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiother Oncol.* 64:259-73.
- Lau, P., J.D. Verrier, J.A. Nielsen, K.R. Johnson, L. Notterpek, and L.D. Hudson. (2008) Identification of dynamically regulated microRNA and mRNA networks in developing oligodendrocytes. *J Neurosci.* 28:11720-30.

- Lavon, I., D. Zrihan, A. Granit, O. Einstein, N. Fainstein, M.A. Cohen, M.A. Cohen, B. Zelikovitch, Y. Shoshan, S. Spektor, B.E. Reubinoff, Y. Felig, O. Gerlitz, T. Ben-Hur, Y. Smith, and T. Siegal. (2010) Gliomas display a microRNA expression profile reminiscent of neural precursor cells. *Neuro Oncol.* 12:422-33.
- Le, Q.T., C. Kong, P.W. Lavori, K. O'Byrne, J.T. Erler, X. Huang, Y. Chen, H. Cao, R. Tibshirani, N. Denko, A.J. Giaccia, and A.C. Koong. (2007) Expression and prognostic significance of a panel of tissue hypoxia markers in head-and-neck squamous cell carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 69:167-75.
- Lee, W.H. (1990) Characterization of a newly established malignant meningioma cell line of the human brain: IOMM-Lee. *Neurosurgery.* 27:389-95; discussion 396.
- Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 75:843-54.
- Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, and V.N. Kim. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature.* 425:415-9.
- Lee, Y., M. Kim, J. Han, K.H. Yeom, S. Lee, S.H. Baek, and V.N. Kim. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *Embo J.* 23:4051-60.
- Lee, Y.S., and A. Dutta. (2007) The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev.* 21:1025-30.
- Lee, D.Y., Z. Deng, C.H. Wang, and B.B. Yang. (2007) MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:20350-5.
- Lee, J.L., M.J. Wang, and J.Y. Chen. (2009a) Acetylation and activation of STAT3 mediated by nuclear translocation of CD44. *J Cell Biol.* 185:949-57.
- Lee, S.M., J.H. Kim, E.J. Cho, and H.D. Youn. (2009b) A nucleocytoplasmic malate dehydrogenase regulates p53 transcriptional activity in response to metabolic stress. *Cell Death Differ.* 16:738-48.
- le Sage, C., R. Nagel, D.A. Egan, M. Schrier, E. Mesman, A. Mangiola, C. Anile, G. Maira, N. Mercatelli, S.A. Ciafre, M.G. Farace, and R. Agami. (2007) Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *Embo J.* 26:3699-708.
- Leuschner, P.J., S.L. Ameres, S. Kueng, and J. Martinez. (2006) Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep.* 7:314-20.
- Lewis, B.P., I.H. Shih, M.W. Jones-Rhoades, D.P. Bartel, and C.B. Burge. (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell.* 115:787-98.
- Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel. (2005) Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 120:15-20.
- Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri, and X. Wang. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 91:479-89.

- Li, W., R. Duan, F. Kooy, S.L. Sherman, W. Zhou, and P. Jin.** (2009) Germline mutation of microRNA-125a is associated with breast cancer. *J Med Genet.* 46:358-60.
- Li, A., J. Walling, S. Ahn, Y. Kotliarov, Q. Su, M. Quezado, J.C. Oberholtzer, J. Park, J.C. Zenklusen, and H.A. Fine.** (2009) Unsupervised analysis of transcriptomic profiles reveals six glioma subtypes. *Cancer Res.* 69:2091-9.
- Lim, L.P., M.E. Glasner, S. Yekta, C.B. Burge, and D.P. Bartel.** (2003) Vertebrate microRNA genes. *Science.* 299:1540.
- Lingel, A., B. Simon, E. Izaurralde, and M. Sattler.** (2004) Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat Struct Mol Biol.* 11:576-7.
- Liu, J., M.A. Carmell, F.V. Rivas, C.G. Marsden, J.M. Thomson, J.J. Song, S.M. Hammond, L. Joshua-Tor, and G.J. Hannon.** (2004) Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* 305:1437-41.
- Liu, J., F.V. Rivas, J. Wohlschlegel, J.R. Yates, 3rd, R. Parker, and G.J. Hannon.** (2005) A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol.* 7:1261-6.
- Lodygin, D., V. Tarasov, A. Epanchintsev, C. Berking, T. Knyazeva, H. Korner, P. Knyazev, J. Diebold, and H. Hermeking.** (2008) Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle.* 7:2591-600.
- Longstreth, W.T., Jr., L.K. Dennis, V.M. McGuire, M.T. Drangsholt, and T.D. Koepsell.** (1993) Epidemiology of intracranial meningioma. *Cancer.* 72:639-48.
- Louis, D.N., H. Ohgaki, O.D. Wiestler, W.K. Cavenee, P.C. Burger, A. Jouvett, B.W. Scheithauer, and P. Kleihues.** (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 114:97-109.
- Love, T.M., H.F. Moffett, and C.D. Novina.** (2008) Not miR-ly small RNAs: big potential for microRNAs in therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 121:309-19.
- Lu, J., G. Getz, E.A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B.L. Ebert, R.H. Mak, A.A. Ferrando, J.R. Downing, T. Jacks, H.R. Horvitz, and T.R. Golub.** (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 435:834-8.
- Lujambio, A., S. Ropero, E. Ballestar, M.F. Fraga, C. Cerrato, F. Setien, S. Casado, A. Suarez-Gauthier, M. Sanchez-Cespedes, A. Git, I. Spiteri, P.P. Das, C. Caldas, E. Miska, and M. Esteller.** (2007) Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 67:1424-9.
- Lund, E., S. Guttinger, A. Calado, J.E. Dahlberg, and U. Kutay.** (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science.* 303:95-8.
- Ma, J.B., K. Ye, and D.J. Patel.** (2004) Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature.* 429:318-22.
- MacRae, I.J., E. Ma, M. Zhou, C.V. Robinson, and J.A. Doudna.** (2008) In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:512-7.
- Malone, C.D., J. Brennecke, M. Dus, A. Stark, W.R. McCombie, R. Sachidanandam, and G.J. Hannon.** (2009) Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell.* 137:522-35.

- Malzkorn, B., M. Wolter, F. Liesenberg, M. Grzendowski, K. Stuhler, H.E. Meyer, and G. Reifenberger.** (2010) Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas. *Brain Pathol.* 20:539-50.
- Maniataki, E., and Z. Mourelatos.** (2005) A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev.* 19:2979-90.
- Mantle, R.E., B. Lach, M.R. Delgado, S. Baesa, and G. Belanger.** (1999) Predicting the probability of meningioma recurrence based on the quantity of peritumoral brain edema on computerized tomography scanning. *J Neurosurg.* 91:375-83.
- Maragkakis, M., M. Reczko, V.A. Simossis, P. Alexiou, G.L. Papadopoulos, T. Dalamagas, G. Giannopoulos, G. Goumas, E. Koukis, K. Kourtis, T. Vergoulis, N. Koziris, T. Sellis, P. Tsanakas, and A.G. Hatzigeorgiou.** (2009) DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res.* 37:W273-6.
- Maroney, P.A., Y. Yu, J. Fisher, and T.W. Nilsen.** (2006) Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol.* 13:1102-7.
- Marson, A., S.S. Levine, M.F. Cole, G.M. Frampton, T. Brambrink, S. Johnstone, M.G. Guenther, W.K. Johnston, M. Wernig, J. Newman, J.M. Calabrese, L.M. Dennis, T.L. Volkert, S. Gupta, J. Love, N. Hannett, P.A. Sharp, D.P. Bartel, R. Jaenisch, and R.A. Young.** (2008) Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell.* 134:521-33.
- Matranga, C., Y. Tomari, C. Shin, D.P. Bartel, and P.D. Zamore.** (2005) Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell.* 123:607-20.
- Mayr, C., M.T. Hemann, and D.P. Bartel.** (2007) Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science.* 315:1576-9.
- McClatchey, A.I., I. Saitome, K. Mercer, D. Crowley, J.F. Gusella, R.T. Bronson, and T. Jacks.** (1998) Mice heterozygous for a mutation at the Nf2 tumor suppressor locus develop a range of highly metastatic tumors. *Genes Dev.* 12:1121-33.
- Megraw, M., V. Baev, V. Rusinov, S.T. Jensen, K. Kalantidis, and A.G. Hatzigeorgiou.** (2006) MicroRNA promoter element discovery in Arabidopsis. *Rna.* 12:1612-9.
- Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng, and T. Tuschl.** (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell.* 15:185-97.
- Mellinghoff, I.K., M.Y. Wang, I. Vivanco, D.A. Haas-Kogan, S. Zhu, E.Q. Dia, K.V. Lu, K. Yoshimoto, J.H. Huang, D.J. Chute, B.L. Riggs, S. Horvath, L.M. Liau, W.K. Cavenee, P.N. Rao, R. Beroukhi, T.C. Peck, J.C. Lee, W.R. Sellers, D. Stokoe, M. Prados, T.F. Cloughesy, C.L. Sawyers, and P.S. Mischel.** (2005) Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med.* 353:2012-24.
- Mello, C.C., and D. Conte, Jr.** (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature.* 431:338-42.
- Meng, F., R. Henson, H. Wehbe-Janek, H. Smith, Y. Ueno, and T. Patel.** (2007) The MicroRNA let-7a modulates interleukin-6-dependent STAT-3 survival signaling in malignant human cholangiocytes. *J Biol Chem.* 282:8256-64.

- Merritt, W.M., Y.G. Lin, L.Y. Han, A.A. Kamat, W.A. Spannuth, R. Schmandt, D. Urbauer, L.A. Pennacchio, J.F. Cheng, A.M. Nick, M.T. Deavers, A. Mourad-Zeidan, H. Wang, P. Mueller, M.E. Lenburg, J.W. Gray, S. Mok, M.J. Birrer, G. Lopez-Berestein, R.L. Coleman, M. Bar-Eli, and A.K. Sood. (2008) Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med.* 359:2641-50.
- Meyer, B., S. Loeschke, A. Schultze, T. Weigel, M. Sandkamp, T. Goldmann, E. Vollmer, and J. Bullerdiek. (2007) HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer. *Mol Carcinog.* 46:503-11.
- Mi, S., J. Lu, M. Sun, Z. Li, H. Zhang, M.B. Neilly, Y. Wang, Z. Qian, J. Jin, Y. Zhang, S.K. Bohlander, M.M. Le Beau, R.A. Larson, T.R. Golub, J.D. Rowley, and J. Chen. (2007) MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:19971-6.
- Mihaila, D., M. Jankowski, J.A. Gutierrez, M.L. Rosenblum, I.F. Newsham, O. Bogler, and S.A. Rempel. (2003) Meningiomas: loss of heterozygosity on chromosome 10 and marker-specific correlations with grade, recurrence, and survival. *Clin Cancer Res.* 9:4443-51.
- Mitchell, P.S., R.K. Parkin, E.M. Kroh, B.R. Fritz, S.K. Wyman, E.L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K.C. O'Briant, A. Allen, D.W. Lin, N. Urban, C.W. Drescher, B.S. Knudsen, D.L. Stirewalt, R. Gentleman, R.L. Vessella, P.S. Nelson, D.B. Martin, and M. Tewari. (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:10513-8.
- Momota, H., E. Nerio, and E.C. Holland. (2005) Perifosine inhibits multiple signaling pathways in glial progenitors and cooperates with temozolomide to arrest cell proliferation in gliomas in vivo. *Cancer Res.* 65:7429-35.
- Morin, R.D., M.D. O'Connor, M. Griffith, F. Kuchenbauer, A. Delaney, A.L. Prabhu, Y. Zhao, H. McDonald, T. Zeng, M. Hirst, C.J. Eaves, and M.A. Marra. (2008) Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res.* 18:610-21.
- Mourelatos, Z., J. Dostie, S. Paushkin, A. Sharma, B. Charroux, L. Abel, J. Rappsilber, M. Mann, and G. Dreyfuss. (2002) miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 16:720-8.
- Mudduluru, G., F. Medved, R. Grobholz, C. Jost, A. Gruber, J.H. Leupold, S. Post, A. Jansen, N.H. Colburn, and H. Allgayer. (2007) Loss of programmed cell death 4 expression marks adenoma-carcinoma transition, correlates inversely with phosphorylated protein kinase B, and is an independent prognostic factor in resected colorectal cancer. *Cancer.* 110:1697-707.
- Nakamura, M., T. Watanabe, U. Klangby, C. Asker, K. Wiman, Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki. (2001a) p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol.* 11:159-68.
- Nakamura, M., Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki. (2001b) Promoter hypermethylation of the RB1 gene in glioblastomas. *Lab Invest.* 81:77-82.
- Nakamura, M., T. Watanabe, Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki. (2001c) Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G:C --> A:T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis.* 22:1715-9.

- Nasser, M.W., J. Datta, G. Nuovo, H. Kutay, T. Motiwala, S. Majumder, B. Wang, S. Suster, S.T. Jacob, and K. Ghoshal. (2008) Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *J Biol Chem.* 283:33394-405.
- Nelson, P.T., D.A. Baldwin, W.P. Kloosterman, S. Kauppinen, R.H. Plasterk, and Z. Mourelatos. (2006) RAKE and LNA-ISH reveal microRNA expression and localization in archival human brain. *Rna.* 12:187-91.
- Newton, H.B. (2007) Hydroxyurea chemotherapy in the treatment of meningiomas. *Neurosurg Focus.* 23:E11.
- Nilsson, C.L., R. Dillon, A. Devakumar, S.D. Shi, M. Greig, J.C. Rogers, B. Krastins, M. Rosenblatt, G. Kilmer, M. Major, B.J. Kaboord, D. Sarracino, T. Rezai, A. Prakash, M. Lopez, Y. Ji, W. Priebe, F.F. Lang, H. Colman, and C.A. Conrad. (2010) Quantitative phosphoproteomic analysis of the STAT3/IL-6/HIF1alpha signaling network: an initial study in GSC11 glioblastoma stem cells. *J Proteome Res.* 9:430-43.
- Nobusawa, S., T. Watanabe, P. Kleihues, and H. Ohgaki. (2009) IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin Cancer Res.* 15:6002-7.
- Nottrott, S., M.J. Simard, and J.D. Richter. (2006) Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol.* 13:1108-14.
- Obernosterer, G., P.J. Leuschner, M. Alenius, and J. Martinez. (2006) Post-transcriptional regulation of microRNA expression. *Rna.* 12:1161-7.
- O'Donnell, K.A., E.A. Wentzel, K.I. Zeller, C.V. Dang, and J.T. Mendell. (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature.* 435:839-43.
- Ohgaki, H., R.H. Eibl, O.D. Wiestler, M.G. Yasargil, E.W. Newcomb, and P. Kleihues. (1991) p53 mutations in nonastrocytic human brain tumors. *Cancer Res.* 51:6202-5.
- Ohgaki, H., P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P.L. Di Patre, C. Burkhard, D. Schuler, N.M. Probst-Hensch, P.C. Maiorka, N. Baeza, P. Pisani, Y. Yonekawa, M.G. Yasargil, U.M. Lutolf, and P. Kleihues. (2004) Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res.* 64:6892-9.
- Ohgaki, H., and P. Kleihues. (2007) Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol.* 170:1445-53.
- Ohler, U., S. Yekta, L.P. Lim, D.P. Bartel, and C.B. Burge. (2004) Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification. *Rna.* 10:1309-22.
- Okamura, K., A. Ishizuka, H. Siomi, and M.C. Siomi. (2004) Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev.* 18:1655-66.
- Okamura, K., J.W. Hagen, H. Duan, D.M. Tyler, and E.C. Lai. (2007) The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. *Cell.* 130:89-100.
- Okamura, K., M.D. Phillips, D.M. Tyler, H. Duan, Y.T. Chou, and E.C. Lai. (2008) The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol.* 15:354-63.

- Olsen, P.H., and V. Ambros.** (1999) The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol.* 216:671-80.
- Ovcharenko, D., K. Kelnar, C. Johnson, N. Leng, and D. Brown.** (2007) Genome-scale microRNA and small interfering RNA screens identify small RNA modulators of TRAIL-induced apoptosis pathway. *Cancer Res.* 67:10782-8.
- Ozsolak, F., L.L. Poling, Z. Wang, H. Liu, X.S. Liu, R.G. Roeder, X. Zhang, J.S. Song, and D.E. Fisher.** (2008) Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* 22:3172-83.
- Papadopoulos, G.L., M. Reczko, V.A. Simossis, P. Sethupathy, and A.G. Hatzigeorgiou.** (2009) The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase. *Nucleic Acids Res.* 37:D155-8.
- Papagiannakopoulos, T., A. Shapiro, and K.S. Kosik.** (2008) MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res.* 68:8164-72.
- Parker, J.S., S.M. Roe, and D. Barford.** (2004) Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *Embo J.* 23:4727-37.
- Parker, R., and H. Song.** (2004) The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol.* 11:121-7.
- Pasquinelli, A.E., B.J. Reinhart, F. Slack, M.Q. Martindale, M.I. Kuroda, B. Maller, D.C. Hayward, E.E. Ball, B. Degnan, P. Muller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman, J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P. Leahy, E. Davidson, and G. Ruvkun.** (2000) Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature.* 408:86-9.
- Pasquinelli, A.E., S. Hunter, and J. Bracht.** (2005) MicroRNAs: a developing story. *Curr Opin Genet Dev.* 15:200-5.
- Pestova, T.V., V.G. Kolupaeva, I.B. Lmakin, E.V. Pilipenko, I.N. Shatsky, V.I. Agol, and C.U. Hellen.** (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:7029-36.
- Petersen, C.P., M.E. Bordeleau, J. Pelletier, and P.A. Sharp.** (2006) Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell.* 21:533-42.
- Petrocca, F., R. Visone, M.R. Onelli, M.H. Shah, M.S. Nicoloso, I. de Martino, D. Iliopoulos, E. Pilozzi, C.G. Liu, M. Negrini, L. Cavazzini, S. Volinia, H. Alder, L.P. Ruco, G. Baldassarre, C.M. Croce, and A. Vecchione.** (2008) E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell.* 13:272-86.
- Phillips, H.S., S. Kharbanda, R. Chen, W.F. Forrest, R.H. Soriano, T.D. Wu, A. Misra, J.M. Nigro, H. Colman, L. Soroceanu, P.M. Williams, Z. Modrusan, B.G. Feuerstein, and K. Aldape.** (2006) Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell.* 9:157-73.
- Pillai, R.S., S.N. Bhattacharyya, C.G. Artus, T. Zoller, N. Cougot, E. Basyuk, E. Bertrand, and W. Filipowicz.** (2005) Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science.* 309:1573-6.

- Poliseno, L., A. Tuccoli, L. Mariani, M. Evangelista, L. Citti, K. Woods, A. Mercatanti, S. Hammond, and G. Rainaldi.** (2006) MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*. 108:3068-71.
- Puttmann, S., V. Senner, S. Braune, B. Hillmann, R. Exeler, C.H. Rickert, and W. Paulus.** (2005) Establishment of a benign meningioma cell line by hTERT-mediated immortalization. *Lab Invest*. 85:1163-71.
- Rand, T.A., S. Petersen, F. Du, and X. Wang.** (2005) Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*. 123:621-9.
- Raver-Shapira, N., E. Marciano, E. Meiri, Y. Spector, N. Rosenfeld, N. Moskovits, Z. Bentwich, and M. Oren.** (2007) Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell*. 26:731-43.
- Reddy, S.D., K. Ohshiro, S.K. Rayala, and R. Kumar.** (2008) MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer Res*. 68:8195-200.
- Reed, J.C., J.M. Jurgensmeier, and S. Matsuyama.** (1998) Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. 1366:127-37.
- Reifenberger, G., L. Liu, K. Ichimura, E.E. Schmidt, and V.P. Collins.** (1993) Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res*. 53:2736-9.
- Reifenberger, J., G. Reifenberger, L. Liu, C.D. James, W. Wechsler, and V.P. Collins.** (1994) Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *Am J Pathol*. 145:1175-90.
- Reifenberger, J., G. Reifenberger, K. Ichimura, E.E. Schmidt, W. Wechsler, and V.P. Collins.** (1996) Epidermal growth factor receptor expression in oligodendroglial tumors. *Am J Pathol*. 149:29-35.
- Reinhart, B.J., F.J. Slack, M. Basson, A.E. Pasquinelli, J.C. Bettinger, A.E. Rougvie, H.R. Horvitz, and G. Ruvkun.** (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403:901-6.
- Reinhart, B.J., E.G. Weinstein, M.W. Rhoades, B. Bartel, and D.P. Bartel.** (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev*. 16:1616-26.
- Rempel, S.A., S. Ge, and J.A. Gutierrez.** (1999) SPARC: a potential diagnostic marker of invasive meningiomas. *Clin Cancer Res*. 5:237-41.
- Rhoades, M.W., B.J. Reinhart, L.P. Lim, C.B. Burge, B. Bartel, and D.P. Bartel.** (2002) Prediction of plant microRNA targets. *Cell*. 110:513-20.
- Robb, G.B., and T.M. Rana.** (2007) RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol Cell*. 26:523-37.
- Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, J.L. Ashurst, and A. Bradley.** (2004) Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 14:1902-10.
- Rogers, L., and M. Mehta.** (2007) Role of radiation therapy in treating intracranial meningiomas. *Neurosurg Focus*. 23:E4.

- Ruby, J.G., C.H. Jan, and D.P. Bartel.** (2007) Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 448:83-6.
- Sage, E.H., and P. Bornstein.** (1991) Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J Biol Chem*. 266:14831-4.
- Saini, H.K., S. Griffiths-Jones, and A.J. Enright.** (2007) Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:17719-24.
- Saini, H.K., A.J. Enright, and S. Griffiths-Jones.** (2008) Annotation of mammalian primary microRNAs. *BMC Genomics*. 9:564.
- Saito, Y., and P.A. Jones.** (2006a) Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle*. 5:2220-2.
- Saito, Y., G. Liang, G. Egger, J.M. Friedman, J.C. Chuang, G.A. Coetzee, and P.A. Jones.** (2006b) Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*. 9:435-43.
- Saito-Ohara, F., I. Imoto, J. Inoue, H. Hosoi, A. Nakagawara, T. Sugimoto, and J. Inazawa.** (2003) PPM1D is a potential target for 17q gain in neuroblastoma. *Cancer Res*. 63:1876-83.
- Sampson, V.B., N.H. Rong, J. Han, Q. Yang, V. Aris, P. Soteropoulos, N.J. Petrelli, S.P. Dunn, and L.J. Krueger.** (2007) MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res*. 67:9762-70.
- Sand, M., T. Gambichler, M. Skrygan, D. Sand, N. Scola, P. Altmeyer, and F.G. Bechara.** (2010) Expression levels of the microRNA processing enzymes Drosha and dicer in epithelial skin cancer. *Cancer Invest*. 28:649-53.
- Sarhadi, V.K., H. Wikman, K. Salmenkivi, E. Kuosma, T. Sioris, J. Salo, A. Karjalainen, S. Knuutila, and S. Anttila.** (2006) Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. *J Pathol*. 209:206-12.
- Sathornsumetee, S., and J.N. Rich.** (2008) Designer therapies for glioblastoma multiforme. *Ann N Y Acad Sci*. 1142:108-32.
- Sato, K., B. Schauble, P. Kleihues, and H. Ohgaki.** (1996) Infrequent alterations of the p15, p16, CDK4 and cyclin D1 genes in non-astrocytic human brain tumors. *Int J Cancer*. 66:305-8.
- Saunders, M.A., H. Liang, and W.H. Li.** (2007) Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:3300-5.
- Sayed, D., M. He, C. Hong, S. Gao, S. Rane, Z. Yang, and M. Abdellatif.** (2010) MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand. *J Biol Chem*. 285:20281-90.
- Schratt, G.M., F. Tuebing, E.A. Nigh, C.G. Kane, M.E. Sabatini, M. Kiebler, and M.E. Greenberg.** (2006) A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature*. 439:283-9.
- Schwarz, D.S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, and P.D. Zamore.** (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 115:199-208.

- Seggerman, K., L. Tang, and E.G. Moss.** (2002) Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol.* 243:215-25.
- Selbach, M., B. Schwanhaussner, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin, and N. Rajewsky.** (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature.* 455:58-63.
- Sethupathy, P., M. Megraw, and A.G. Hatzigeorgiou.** (2006a) A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. *Nat Methods.* 3:881-6.
- Sethupathy, P., B. Corda, and A.G. Hatzigeorgiou.** (2006b) TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets. *Rna.* 12:192-7.
- Sherr, C.J., and J.M. Roberts.** (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13:1501-12.
- Sheth, U., and R. Parker.** (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science.* 300:805-8.
- Shin, C.** (2008) Cleavage of the star strand facilitates assembly of some microRNAs into Ago2-containing silencing complexes in mammals. *Mol Cells.* 26:308-13.
- Silber, J., D.A. Lim, C. Petritsch, A.I. Persson, A.K. Maunakea, M. Yu, S.R. Vandenberg, D.G. Ginzinger, C.D. James, J.F. Costello, G. Bergers, W.A. Weiss, A. Alvarez-Buylla, and J.G. Hodgson.** (2008) miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med.* 6:14.
- Simon, M., A. von Deimling, J.J. Larson, R. Wellenreuther, P. Kaskel, A. Waha, R.E. Warnick, J.M. Tew, Jr., and A.G. Menon.** (1995) Allelic losses on chromosomes 14, 10, and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Res.* 55:4696-701.
- Skog, J., T. Wurdinger, S. van Rijn, D.H. Meijer, L. Gainche, M. Sena-Esteves, W.T. Curry, Jr., B.S. Carter, A.M. Krichevsky, and X.O. Breakefield.** (2008) Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* 10:1470-6.
- Smirnova, L., A. Grafe, A. Seiler, S. Schumacher, R. Nitsch, and F.G. Wulczyn.** (2005) Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *Eur J Neurosci.* 21:1469-77.
- Smith, J.S., B. Alderete, Y. Minn, T.J. Borell, A. Perry, G. Mohapatra, S.M. Hosek, D. Kimmel, J. O'Fallon, A. Yates, B.G. Feuerstein, P.C. Burger, B.W. Scheithauer, and R.B. Jenkins.** (1999) Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene.* 18:4144-52.
- Song, J.J., J. Liu, N.H. Tolia, J. Schneiderman, S.K. Smith, R.A. Martienssen, G.J. Hannon, and L. Joshua-Tor.** (2003) The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol.* 10:1026-32.
- Song, J.J., S.K. Smith, G.J. Hannon, and L. Joshua-Tor.** (2004) Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science.* 305:1434-7.
- Soyuer, S., E.L. Chang, U. Selek, W. Shi, M.H. Maor, and F. DeMonte.** (2004) Radiotherapy after surgery for benign cerebral meningioma. *Radiother Oncol.* 71:85-90.

- Stenvang, J., A.N. Silahdaroglu, M. Lindow, J. Elmen, and S. Kauppinen.** (2008) The utility of LNA in microRNA-based cancer diagnostics and therapeutics. *Semin Cancer Biol.* 18:89-102.
- Strojnjk, T., B. Zidanik, J. Kos, and T.T. Lah.** (2001) Cathepsins B and L are markers for clinically invasive types of meningiomas. *Neurosurgery.* 48:598-605.
- Stupp, R., W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R.C. Janzer, S.K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J.G. Cairncross, E. Eisenhauer, and R.O. Mirimanoff.** (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 352:987-96.
- Suarez, Y., C. Fernandez-Hernando, J.S. Pober, and W.C. Sessa.** (2007) Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res.* 100:1164-73.
- Sugito, N., H. Ishiguro, Y. Kuwabara, M. Kimura, A. Mitsui, H. Kurehara, T. Ando, R. Mori, N. Takashima, R. Ogawa, and Y. Fujii.** (2006) RNASEN regulates cell proliferation and affects survival in esophageal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 12:7322-8.
- Taguchi, A., K. Yanagisawa, M. Tanaka, K. Cao, Y. Matsuyama, H. Goto, and T. Takahashi.** (2008) Identification of hypoxia-inducible factor-1 alpha as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster. *Cancer Res.* 68:5540-5.
- Tam, W., S.H. Hughes, W.S. Hayward, and P. Besmer.** (2002) Avian bic, a gene isolated from a common retroviral site in avian leukosis virus-induced lymphomas that encodes a noncoding RNA, cooperates with c-myc in lymphomagenesis and erythroleukemogenesis. *J Virol.* 76:4275-86.
- Tan, L.P., E. Seinen, G. Duns, D. de Jong, O.C. Sibon, S. Poppema, B.J. Kroesen, K. Kok, and A. van den Berg.** (2009) A high throughput experimental approach to identify miRNA targets in human cells. *Nucleic Acids Res.* 37:e137.
- Tanaka, K., C. Sato, Y. Maeda, M. Koike, M. Matsutani, K. Yamada, and M. Miyaki.** (1989) Establishment of a human malignant meningioma cell line with amplified c-myc oncogene. *Cancer.* 64:2243-9.
- Tarasov, V., P. Jung, B. Verdoodt, D. Lodygin, A. Epanchintsev, A. Menssen, G. Meister, and H. Hermeking.** (2007) Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle.* 6:1586-93.
- Tate, P.H., and A.P. Bird.** (1993) Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev.* 3:226-31.
- Tost, J., J. Dunker, and I.G. Gut.** (2003) Analysis and quantification of multiple methylation variable positions in CpG islands by Pyrosequencing. *Biotechniques.* 35:152-6.
- Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J.J. Lee, and J.O. Lotvall.** (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 9:654-9.
- van den Bent, M.J., D. Afra, O. de Witte, M. Ben Hassel, S. Schraub, K. Hoang-Xuan, P.O. Malmstrom, L. Collette, M. Pierart, R. Mirimanoff, and A.B. Karim.** (2005) Long-term

- efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: the EORTC 22845 randomised trial. *Lancet*. 366:985-90.
- Vasudevan, S., and J.A. Steitz.** (2007) AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*. 128:1105-18.
- Vecchione, A., and C.M. Croce.** (2010) Apoptomirs: small molecules have gained the license to kill. *Endocr Relat Cancer*. 17:F37-50.
- Ventura, A., A.G. Young, M.M. Winslow, L. Lintault, A. Meissner, S.J. Erkland, J. Newman, R.T. Bronson, D. Crowley, J.R. Stone, R. Jaenisch, P.A. Sharp, and T. Jacks.** (2008) Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*. 132:875-86.
- Verhagen, A.M., P.G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L.M. Connolly, G.E. Reid, R.L. Moritz, R.J. Simpson, and D.L. Vaux.** (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*. 102:43-53.
- Vinther, J., M.M. Hedegaard, P.P. Gardner, J.S. Andersen, and P. Arctander.** (2006) Identification of miRNA targets with stable isotope labeling by amino acids in cell culture. *Nucleic Acids Res*. 34:e107.
- Vives, K.P., and J.M. Piepmeier.** (1999) Complications and expected outcome of glioma surgery. *J Neurooncol*. 42:289-302.
- Vo, N., M.E. Klein, O. Varlamova, D.M. Keller, T. Yamamoto, R.H. Goodman, and S. Impey.** (2005) A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:16426-31.
- Volinia, S., G.A. Calin, C.G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R.L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C.C. Harris, and C.M. Croce.** (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:2257-61.
- Voorhoeve, P.M., C. le Sage, M. Schrier, A.J. Gillis, H. Stoop, R. Nagel, Y.P. Liu, J. van Duijse, J. Drost, A. Griekspoor, E. Zlotorynski, N. Yabuta, G. De Vita, H. Nojima, L.H. Looijenga, and R. Agami.** (2006) A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*. 124:1169-81.
- Vousden, K.H., and X. Lu.** (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer*. 2:594-604.
- Walker, M.D., E. Alexander, Jr., W.E. Hunt, C.S. MacCarty, M.S. Mahaley, Jr., J. Mealey, Jr., H.A. Norrell, G. Owens, J. Ransohoff, C.B. Wilson, E.A. Gehan, and T.A. Strike.** (1978) Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg*. 49:333-43.
- Wang, S., A.B. Aurora, B.A. Johnson, X. Qi, J. McAnally, J.A. Hill, J.A. Richardson, R. Bassel-Duby, and E.N. Olson.** (2008) The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*. 15:261-71.
- Wang, B., S. Li, H.H. Qi, D. Chowdhury, Y. Shi, and C.D. Novina.** (2009) Distinct passenger strand and mRNA cleavage activities of human Argonaute proteins. *Nat Struct Mol Biol*. 16:1259-66.

- Wang, Y., and C.G. Lee.** (2009) MicroRNA and cancer--focus on apoptosis. *J Cell Mol Med.* 13:12-23.
- Wang, S., and E.N. Olson.** (2009) AngiomiRs--key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 19:205-11.
- Wang, V., and W. Wu.** (2009) MicroRNA-based therapeutics for cancer. *BioDrugs.* 23:15-23.
- Watanabe, T., A. Takeda, T. Tsukiyama, K. Mise, T. Okuno, H. Sasaki, N. Minami, and H. Imai.** (2006) Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev.* 20:1732-43.
- Watanabe, T., Y. Totoki, A. Toyoda, M. Kaneda, S. Kuramochi-Miyagawa, Y. Obata, H. Chiba, Y. Kohara, T. Kono, T. Nakano, M.A. Surani, Y. Sakaki, and H. Sasaki.** (2008) Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature.* 453:539-43.
- Wiestner, A., M. Tehrani, M. Chiorazzi, G. Wright, F. Gibellini, K. Nakayama, H. Liu, A. Rosenwald, H.K. Muller-Hermelink, G. Ott, W.C. Chan, T.C. Greiner, D.D. Weisenburger, J. Vose, J.O. Armitage, R.D. Gascoyne, J.M. Connors, E. Campo, E. Montserrat, F. Bosch, E.B. Smeland, S. Kvaloy, H. Holte, J. Delabie, R.I. Fisher, T.M. Grogan, T.P. Miller, W.H. Wilson, E.S. Jaffe, and L.M. Staudt.** (2007) Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival. *Blood.* 109:4599-606.
- Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun.** (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 75:855-62.
- Wu, L., and J.G. Belasco.** (2005) Micro-RNA regulation of the mammalian *lin-28* gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol.* 25:9198-208.
- Wu, L., J. Fan, and J.G. Belasco.** (2006) MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:4034-9.
- Wurdinger, T., B.A. Tannous, O. Saydam, J. Skog, S. Grau, J. Soutschek, R. Weissleder, X.O. Breakefield, and A.M. Krichevsky.** (2008) miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell.* 14:382-93.
- Xi, Y., R. Shalgi, O. Fodstad, Y. Pilpel, and J. Ju.** (2006) Differentially regulated micro-RNAs and actively translated messenger RNA transcripts by tumor suppressor p53 in colon cancer. *Clin Cancer Res.* 12:2014-24.
- Xu, C., Y. Lu, Z. Pan, W. Chu, X. Luo, H. Lin, J. Xiao, H. Shan, Z. Wang, and B. Yang.** (2007) The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J Cell Sci.* 120:3045-52.
- Xu, B., N.H. Feng, P.C. Li, J. Tao, D. Wu, Z.D. Zhang, N. Tong, J.F. Wang, N.H. Song, W. Zhang, L.X. Hua, and H.F. Wu.** (2010) A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate.* 70:467-72.
- Yamakuchi, M., M. Ferlito, and C.J. Lowenstein.** (2008) miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:13421-6.

- Yan, H.L., G. Xue, Q. Mei, Y.Z. Wang, F.X. Ding, M.F. Liu, M.H. Lu, Y. Tang, H.Y. Yu, and S.H. Sun.** (2009) Repression of the miR-17-92 cluster by p53 has an important function in hypoxia-induced apoptosis. *Embo J.* 28:2719-32.
- Yanaihara, N., N. Caplen, E. Bowman, M. Seike, K. Kumamoto, M. Yi, R.M. Stephens, A. Okamoto, J. Yokota, T. Tanaka, G.A. Calin, C.G. Liu, C.M. Croce, and C.C. Harris.** (2006) Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 9:189-98.
- Yi, R., B.P. Doehle, Y. Qin, I.G. Macara, and B.R. Cullen.** (2005) Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *Rna.* 11:220-6.
- Yoda, M., T. Kawamata, Z. Paroo, X. Ye, S. Iwasaki, Q. Liu, and Y. Tomari.** (2010) ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol.* 17:17-23.
- Yu, Z., Z. Li, N. Jolicœur, L. Zhang, Y. Fortin, E. Wang, M. Wu, and S.H. Shen.** (2007) Aberrant allele frequencies of the SNPs located in microRNA target sites are potentially associated with human cancers. *Nucleic Acids Res.* 35:4535-41.
- Yuan, Y.R., Y. Pei, J.B. Ma, V. Kuryavyi, M. Zhadina, G. Meister, H.Y. Chen, Z. Dauter, T. Tuschl, and D.J. Patel.** (2005) Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell.* 19:405-19.
- Zeng, Y., and B.R. Cullen.** (2004) Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.* 32:4776-85.
- Zhang, H., F.A. Kolb, V. Brondani, E. Billy, and W. Filipowicz.** (2002) Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *Embo J.* 21:5875-85.
- Zhang, H., F.A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof, and W. Filipowicz.** (2004) Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell.* 118:57-68.
- Zhang, L., and G. Coukos.** (2006) MicroRNAs: a new insight into cancer genome. *Cell Cycle.* 5:2216-9.
- Zhang, C.Z., J.X. Zhang, A.L. Zhang, Z.D. Shi, L. Han, Z.F. Jia, W.D. Yang, G.X. Wang, T. Jiang, Y.P. You, P.Y. Pu, J.Q. Cheng, and C.S. Kang.** (2010) MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma. *Mol Cancer.* 9:229.
- Zhou, X., J. Ruan, G. Wang, and W. Zhang.** (2007) Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. *PLoS Comput Biol.* 3:e37.
- Zhu, S., M.L. Si, H. Wu, and Y.Y. Mo.** (2007) MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem.* 282:14328-36.

Annexes





Tableau 12 : Echantillons tissulaires utilisés pour cette étude, à savoir des glioblastomes, des tumeurs oligodendrogiales et des méningiomes comme tissus tumoraux et des échantillons contrôles.

Type d'échantillon	Numéro	Statut	Remarques	Sexe	Age
Gliomes	1	ODG grade B	Statut à déterminer de manière moléculaire (Résultats Partie II- I)	F	30 ans
	2	ODG grade A		M	43 ans
	3	ODG grade A		F	45 ans
	4	ODG grade A		M	45 ans
	5	GBM		M	56 ans
	6			M	65 ans
	7			M	68 ans
	8			M	62 ans
	9			M	65 ans
	10			M	50 ans
	11	ODG grade A		M	42 ans
	12	ODG grade B		M	38 ans
	13	OA grade A		F	24 ans
	14	ODG grade A		M	30 ans
	15	ODG grade A		M	32 ans
	16	GBM		M	58 ans
	17			M	56 ans
	18			F	65 ans
	19			M	36 ans
	20			M	56 ans
	21			F	50 ans
	22	Statut ambigu		M	19 ans
	23			F	46 ans
	24			M	43 ans
	25			M	56 ans
Echantillons contrôles	1	/	/	F	20 ans
	2			F	39 ans
	3			F	43 ans
	4			F	50 ans
	5			M	45 ans
	6			M	49 ans
Méningiomes	1	Invasif	A confirmer par études d'invasivité <i>in vitro</i> (Résultats Partie I-I)	F	53 ans
	2			F	50 ans
	3			F	34 ans
	4			F	53 ans
	5			F	61 ans
	6	Non Invasif		M	62 ans
	7			M	48 ans
	8			F	38 ans
	9			F	51 ans
	10			F	54 ans

L'âge des patients correspond à leur âge au moment de l'opération.

Annexe 2: Protocole de l'électrophorèse miniature sur puce Agilent Nano 6000

Le kit utilisé est le RNA 6000 Nano kit (Agilent).

- Filtrer 200µl de RNA 6000 Nano gel par centrifugation à 1500g pendant 10 minutes
- Equilibrer le RNA 6000 Nano dye à température ambiante.
- Mélanger 32.5µl de gel filtré avec 0.5µl de dye et homogénéiser manuellement
- Centrifuger ce mélange à 13000g pendant 10 minutes
- Déposer 9µl dans le puits  de la puce RNA 6000 Nano chip puis placer la puce dans la station « chip priming »
- Une fois la station fermée, exercer une pression avec la seringue en la poussant de 1mL jusqu'à la position clip et la laisser dans cette position pendant 30 secondes
- Lâcher la seringue remonter jusqu'à 1mL
- Ouvrir la station et déposer 9µl dans chacun des deux autres puits 
- Déposer 5µl de RNA 6000 Nano marker dans chacun des 12 puits « échantillons » et le puits 
- Dénaturer les échantillons et le ladder à 72°C pendant 2 minutes puis laisser à 4°C pendant 5 minutes
- Déposer 1µl d'échantillon dans chacun des 12 puits « échantillons » et 1µl de ladder dans le puits 
- Vortexer la puce pendant 1 minute à 2200rpm
- Placer la puce dans le bioanalyseur 2100 et lancer l'analyse

Un exemple de migration des ARN courts et longs est présenté ci-dessous.

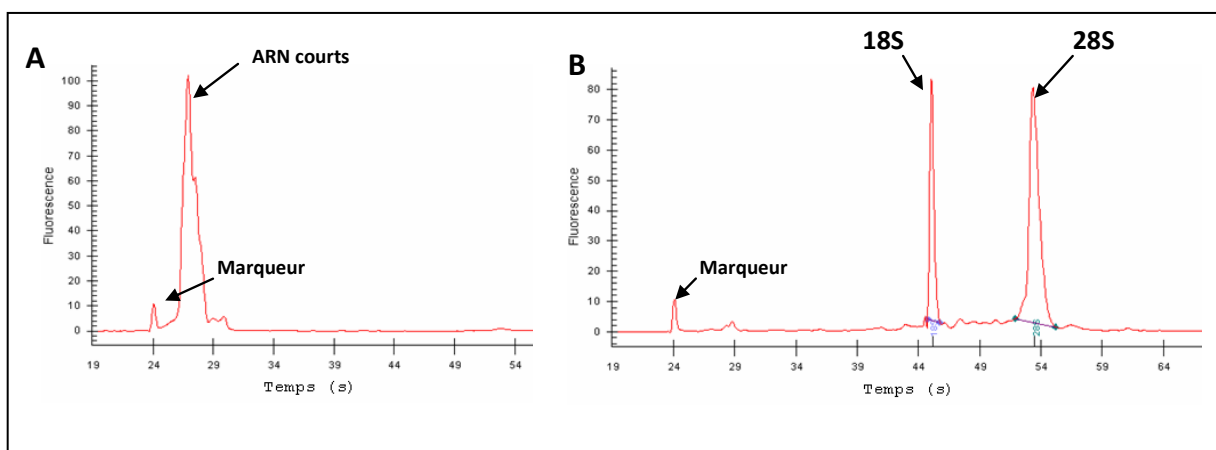


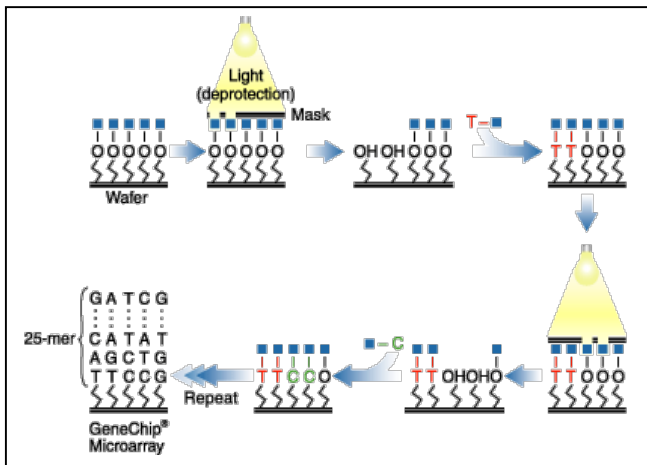
Figure 42 : Profils d'électrophorèse miniature après migration des ARN courts (A) et longs (B) sur puce Agilent RNA Nano 6000.

Les pics annotés 18S et 28S sont les pics d'ARN ribosomiaux 18S et 28S.

Figure 43 : Principe de la synthèse d'oligonucléotides par photolithographie.

Annexe 3 : Principe des puces Affymetrix U133 Plus 2.0 et miRNA Genechip®

La technologie des puces Affymetrix est basée sur l'utilisation d'oligonucléotides de 25 nucléotides synthétisés *in situ* par photolithographie (Figure 43).



- Puces de type U133 Plus 2.0 :

Ces puces permettent de doser l'expression d'environ 39000 gènes humains, certains étant ciblés par plusieurs « probesets » (environ 54000 « probesets » par puce) et chaque probeset est composé de 11 sondes différentes. Dans le corps de la thèse, le terme « probeset » est simplifié par le terme sonde.

Des séquences contrôles sont incluses telles que les contrôles de marquage qui s'hybrident avec des ARN bactériens avec une extrémité polyA présents en quantités différentes : dap, lys, phe, thr, et les contrôles d'hybridation qui reconnaissent les ARN BioB, BioC, BioD, cre qui permettent de s'assurer d'une hybridation correcte et enfin les contrôles de normalisation qui détectent les transcrits des gènes de ménage permettant ainsi de normaliser les données (GAPDH, beta-Actine).

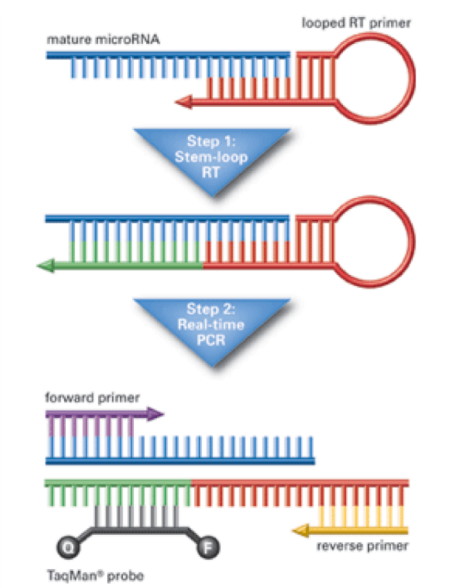
- Puces de type miRNA Genechip® :

Ces puces permettent de doser l'expression de 6703 miARN, 900 snoRNA et 22 scaRNA de 71 espèces différentes dont 847 miARN humains. Les « probesets » sont composés de 4 sondes identiques pour le dosage des miARN.

Des séquences contrôles sont également incluses comme les contrôles d'hybridation identiques aux puces U133 Plus 2.0 mais également des contrôles permettant de s'assurer à la fois de la qualité de la réaction de marquage des miRNA (efficacité de l'extension de l'extrémité polyA, de la réaction de ligature) et mise en évidence de l'absence de RNases.

Figure 45 : Exemple de courbes d'amplification obtenues par RT-PCR quantitative selon le protocole d'Applied Biosystems permettant le dosage des ARN matures.

Annexe 4 : Principe de la RT-PCR quantitative (Applied Biosystems)



La première étape consiste en une transcription inverse (reverse transcription RT) en présence d'une amorce en forme de boucle. Ce type d'amorce permet de doser spécifiquement les miARN matures par hybridation sur les 6-7 bases en 3' du miARN. L'étape de PCR quantitative est réalisée en présence d'amorces sens et antisens et d'une sonde Taqman[®]. Les sondes Taqman sont spécifiques des séquences à amplifier et contiennent un fluorophore appelé Quencher Q et un appelé Reporter R. Lorsque la sonde est intacte, l'énergie émise sous forme de fluorescence par le Reporter après excitation par la lumière incidente est en partie absorbée par le Quencher. Lorsque la sonde est clivée suite à l'action exonucléase de la polymérase, le signal fluorescent émis par le Reporter n'est plus absorbé et peut être quantifié. La fluorescence est alors mesurée en fin de chaque cycle de PCR.

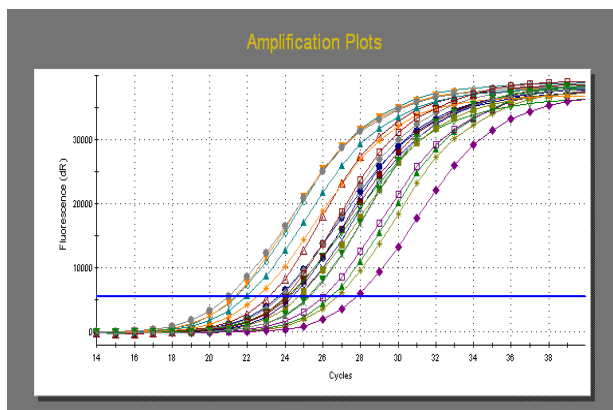
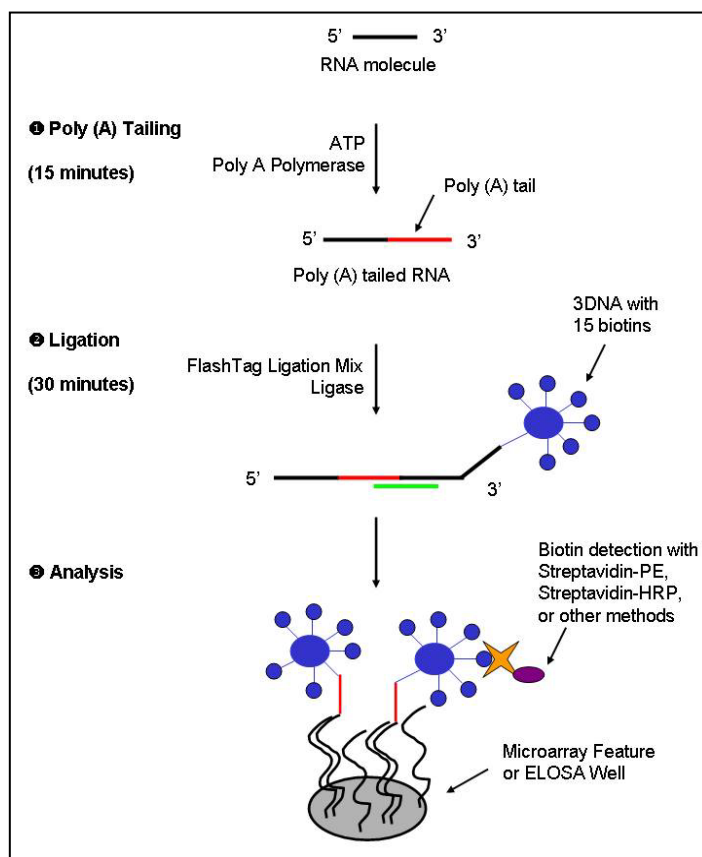


Figure 46 : Principe du marquage des ARN courts par le kit FlashTag Biotin HSR labeling kit (Genisphere) et détection des signaux.

Annexe 5 : Principe du marquage des ARN courts et détection de l'hybridation sur puces Affymetrix de type miRNA Genechip®



Les ARN courts sont marqués grâce au FlashTag™ Biotin HSR labeling kit (Genisphere) qui consiste en une étape de polyadénylation des ARN en 3' puis en une étape de ligature avec un oligonucléotide possédant un dendrimère 3DNA® en son extrémité, dendrimère marqué avec 15 biotines de manière à obtenir un signal amplifié.

Les ARN marqués sont ensuite hybridés dans un premier temps sur plaque ELOSA pour valider un marquage correct puis sur puces Affymetrix de type miRNA Genechip®.

u 13 : Séquences des amorces, tailles des amplicons et température d'hybridation pour la PCR

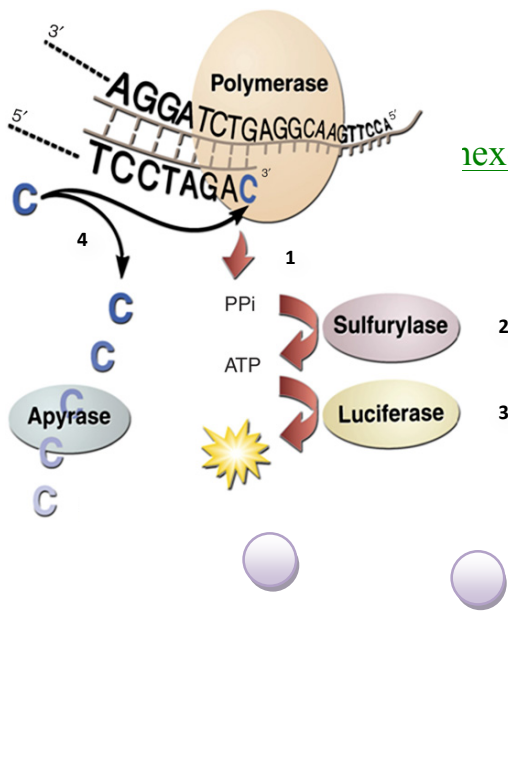
ique.

	Annexe 6 - PCR génomique - Liste des amorces, tailles des amplicons et températures d'hybridation		
	Amorces	Taille des amplicons	Température d'hybridation
mir-7-1	Sens Antisens ATGCAGGACTCCTTCAGTT AGAAGCCATGGTGTCTCAAC	758 pb	61,5°C
mir-7-2	Sens Antisens GAGGAGAGGTGTTCAAAG CTTCAGGTAGTGGTATGG	459 pb	57°C
mir-7-3	Sens Antisens GGTGTTACTGTGCCCATGTG CCTTTGCCTGTGCCTGTATC	539 pb	67°C
mir-9-1	Sens Antisens TCTCCTCCTTTGTATCC CTGTCGTGTCTGTATCTC	406 pb	54°C
mir-9-2	Sens Antisens CTCTCGGCTGTAGTCTTTC GCCGGAGATTACTTGCTG	358 pb	58°C
mir-9-3	Sens Antisens GTGTGCGTGTGTCTGTCCAT GCAAGTGTCCCCAGAGAGAG	388 pb	65°C
mir-21	Sens Antisens GCCTACCATCGTGACATCTC GACTCTAAGTGCCACCAGAC	221 pb	62,5°C
mir-124-1	Sens Antisens GAAGGTGTTGACCCACATAC GAAGACGTCGCTGTATCTC	685 pb	61°C
mir-124-2	Sens Antisens TAGGCGTGTGCTGTAAATGG TTTATGCGCAAGAGATGGG	438 pb	63°C
mir-127	Sens Antisens ACTCGGCTCCGTGTAAGT CACTCTCCCTACTGCCTGAAG	409 pb	61,5°C
mir-128-1	Sens Antisens TTGTAACAGCTGGCAACCA TCCGTTTGATGTCATGCTTT	774 pb	63,1°C
mir-128-2	Sens Antisens GGCTAGGGAACCAAATTAGG CTATGAGTAGCAGCAAGGAG	448 pb	66°C
mir-134	Sens Antisens GACAATGCGCTGACCTAGCTG AACATGGCGTCCCACATCG	486 pb	63,5°C
mir-139	Sens Antisens TTCCTCCTCCCTCTTTCTC CTTTCCCTCTTCCCATTC	422 pb	60,1°C
mir-149	Sens Antisens TCTTGGGCACATTGCTCTC CCGAAACACCCGTAAGATATGG	581 pb	60°C
mir-155	Sens Antisens GCTCCTTCCTTTCAACAG CCCAGTGACCAGATTATG	408 pb	55,5°C
mir-409	Sens Antisens GTGAGGCTCTGGGCTCTGAATG ACTCCAAAGCACCCGTCCTG	557 pb	64,5°C

Tableau 14 : Séquences des amorces, tailles des amplicons, concentrations de MgCl₂ et températures d'hybridation pour la PCR préalable au pyroséquençage.

miRNA	Annexe 7 : PCR pour pyroséquençage - Liste des amorces, tailles des amplicons, concentrations en MgCl ₂ et températures d'hybridation		Taille des amplicons	MgCl ₂	T°C d'hybridation
sa-mir-127	Sens Antisens Séquençage	AGTTTGGAGTTAGGGGTAGGGTAT CTCTCCCCAAACCCTATCATA * GTTTTGTTTAGGGAGTAGT	308 pb	3mM	62°C
sa-mir-124-2	Sens Antisens Séquençage	TGTGTTGTAAATGGTATGGAGATA * CTCATAAACCAACTCCTATCTCT TCTCTAACACATCTACCAAA	140 pb	3mM	62°C
sa-mir-155	Sens Antisens Séquençage	ATGAGGTAGGGATGAAATTTAGGA AATATTTTCCCTTTCCCTTTCT * GGTTGGAGTTTAAGTTTTG	362 pb	4mM	63°C
sa-mir-330	Sens Antisens Séquençage	TTTTAGGGGTGGTTGTGGA CCAAAAACCCTTCCCTCCTAAT * GGGTGGTTGTGGAGG	361 pb	3mM	63°C
sa-mir-210	Sens Antisens Séquençage	GTGAGTTTAGGGTTAGGGAGTTGA ACCTCAAAACTCAAAAATCTTC * TGTTATTTTGGAGTTTATT	283 pb	4mM	60°C
sa-mir-128-1	Sens Antisens Séquençage	AGGGGAAAAGTATGTTGGAAT AACTATCTTCTCTCCACCCCTTTA * GGAAAAGTATGTTGGAAT	473 pb	3mM	63,5°C
sa-mir-339 TSSn°1	Sens Antisens Séquençage	GGGTTTGGTAGGGAGTTGTAGTAT CCCTTACCACCTCCAAAATATTA * ATTTTAAATTGGTTAATAG	369 pb	3mM	63°C
sa-mir-339 TSSn°2	Sens Antisens Séquençage	TGAGAGGATAATGGAGGTAGATGG CCCTACTACAACCCCACTACT * TGAGTTGGTAGGGGTT	205 pb	3mM	63°C

Amorce biotinylée



Le principe du pyrosequençage

- 1) Incorporation d'une base
- 2) Transformation du pyrophosphate libéré en ATP
- 3) Transformation de la luciférine en oxyluciférine
- 4) Elimination de l'excès de nucléotides

Le pyroséquençage est une technique en temps réel faisant intervenir plusieurs enzymes à chaque cycle de séquence. Après hybridation de l'amorce de séquençage et en présence d'une ADN polymérase, un des quatre nucléotides introduits est incorporé dans la séquence (Etape 1). Le pyrophosphate inorganique PPi libéré dès l'incorporation de la base est transformé en ATP par l'ATP sulfurylase (Etape 2). L'ATP produit est utilisé par la luciférase pour la production d'oxyluciférine à partir de luciférine et production concomitante d'un signal lumineux. Un capteur CCD mesure l'intensité de ce signal qui est proportionnelle au nombre de nucléotides identiques incorporés à la suite (Etape 3). En fin de chaque cycle, l'apyrase dégrade l'excès d'ATP et les dNTP non incorporés (Etape 4).

Résumé

Les microARN, ARN courts non codants, jouent un rôle primordial dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes. Une modification d'expression de ces ARN peut donc contribuer à la tumorigenèse et au développement tumoral par dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans des processus clés du cancer. Nous avons souhaité mettre en évidence des signatures spécifiques (i) du phénotype d'invasion des méningiomes et (ii) du phénotype d'agressivité des gliomes par étude des oligodendrogliomes (gliomes de bas grade) et glioblastomes (gliomes de haut grade). (i) Les profils d'expression des microARN dans des méningiomes invasifs montrent des différences par rapport à ceux des méningiomes non invasifs ; confirmant l'intérêt de ces explorations moléculaires pour une application diagnostique directe. (ii) Dans le cas des gliomes, plusieurs miARN ont été détectés et validés et constituent des signatures spécifiques des gliomes en comparaison aux échantillons contrôles. Certains permettent également une distinction aisée des oligodendrogliomes et glioblastomes. Des études génomiques et épigénétiques ont été menées pour rationaliser, du point de vue de la physiopathologie des cellules, les différences d'expression des miARN entre les différents tissus. Au niveau du protéome, des dérégulations d'expression de cibles des miARN identifiés ont été mises en évidence comme celles de MDH1, SIRT1, STAT3 ou PTBP1, protéines clés de la physiologie cellulaire et nous avons pu décrire des voies moléculaires pertinentes du développement tumoral des gliomes.

Mots-clés : Gliomes, méningiomes, microARN, étude transcriptomique, régulation d'expression génique, biomarqueurs.

Abstract

microRNAs, as short endogenous non-coding RNAs, play an important role in post-transcriptional gene silencing. Altered expression of these miRNAs can contribute to the tumorigenesis and tumour development deregulating the expression of key cancer genes. Our study aimed at highlighting specific signatures (i) of the invasive phenotype of meningiomas (ii) of the aggressive phenotype of gliomas studying oligodendrogliomas (low grade) and glioblastomas (high grade). (i) The invasive phenotype of meningiomas, also established *in vitro*, is supported by deregulation of some miRNAs. (ii) As for gliomas, several miRNAs discriminate gliomas vs control tissues and some can also distinguish oligodendrogliomas and glioblastomas. Genomics and epigenetics studies have been run to analyse the effect of the deregulation of expression of these miRNAs on the tumoural cell physiopathology. Some targets of these miRNAs, MDH1, SIRT1, STAT3 ou PTBP1, which are key cellular proteins, have been highlighted as deregulated. Our work suggests some new interesting pathways implicated in glioma development.

Keywords : gliomas, meningiomas, microRNA, transcriptomic study, regulation of gene expression, biomarkers